

**KOLLAGENSYNTHESE VON CHONDROCYTEN –
EIN SYSTEM ZUM STUDIUM DER
GENEXPRESSION IN EUKARYONTEN**

Verena Gauss

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0025

KOLLAGENSYNTHESE VON CHONDROCYTEN -
EIN SYSTEM ZUM STUDIUM DER GENEXPRESSION IN EUKARYONTEN

Inaugural - Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Chemie - Pharmazie an
der Ludwig - Maximilian - Universität
München

vorgelegt von

Verena Gauss

aus

Stuttgart

1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1978



INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
Vorwort	1
1. Einleitung	12
2. Zielsetzung	13
3. Aufgabenstellung	14
4. Ergebnisse	15
5. Zusammenfassung	16
6. Literaturverzeichnis	17
7. Anlagen	18
8. Glossar	19
9. Index	20
10. Bibliographie	21
11. Anlagen	22
12. Glossar	23
13. Index	24
14. Bibliographie	25
15. Anlagen	26
16. Glossar	27
17. Index	28
18. Bibliographie	29
19. Anlagen	30
20. Glossar	31
21. Index	32
22. Bibliographie	33
23. Anlagen	34
24. Glossar	35
25. Index	36
26. Bibliographie	37
27. Anlagen	38
28. Glossar	39
29. Index	40
30. Bibliographie	41
31. Anlagen	42
32. Glossar	43
33. Index	44
34. Bibliographie	45
35. Anlagen	46
36. Glossar	47
37. Index	48
38. Bibliographie	49
39. Anlagen	50
40. Glossar	51
41. Index	52
42. Bibliographie	53
43. Anlagen	54
44. Glossar	55
45. Index	56
46. Bibliographie	57
47. Anlagen	58
48. Glossar	59
49. Index	60
50. Bibliographie	61
51. Anlagen	62
52. Glossar	63
53. Index	64
54. Bibliographie	65
55. Anlagen	66
56. Glossar	67
57. Index	68
58. Bibliographie	69
59. Anlagen	70
60. Glossar	71
61. Index	72
62. Bibliographie	73
63. Anlagen	74
64. Glossar	75
65. Index	76
66. Bibliographie	77
67. Anlagen	78
68. Glossar	79
69. Index	80
70. Bibliographie	81
71. Anlagen	82
72. Glossar	83
73. Index	84
74. Bibliographie	85
75. Anlagen	86
76. Glossar	87
77. Index	88
78. Bibliographie	89
79. Anlagen	90
80. Glossar	91
81. Index	92
82. Bibliographie	93
83. Anlagen	94
84. Glossar	95
85. Index	96
86. Bibliographie	97
87. Anlagen	98
88. Glossar	99
89. Index	100
90. Bibliographie	101
91. Anlagen	102
92. Glossar	103
93. Index	104
94. Bibliographie	105
95. Anlagen	106
96. Glossar	107
97. Index	108
98. Bibliographie	109
99. Anlagen	110
100. Glossar	111
101. Index	112
102. Bibliographie	113
103. Anlagen	114
104. Glossar	115
105. Index	116
106. Bibliographie	117
107. Anlagen	118
108. Glossar	119
109. Index	120
110. Bibliographie	121
111. Anlagen	122
112. Glossar	123
113. Index	124
114. Bibliographie	125
115. Anlagen	126
116. Glossar	127
117. Index	128
118. Bibliographie	129
119. Anlagen	130
120. Glossar	131
121. Index	132
122. Bibliographie	133
123. Anlagen	134
124. Glossar	135
125. Index	136
126. Bibliographie	137
127. Anlagen	138
128. Glossar	139
129. Index	140
130. Bibliographie	141
131. Anlagen	142
132. Glossar	143
133. Index	144
134. Bibliographie	145
135. Anlagen	146
136. Glossar	147
137. Index	148
138. Bibliographie	149
139. Anlagen	150
140. Glossar	151
141. Index	152
142. Bibliographie	153
143. Anlagen	154
144. Glossar	155
145. Index	156
146. Bibliographie	157
147. Anlagen	158
148. Glossar	159
149. Index	160
150. Bibliographie	161
151. Anlagen	162
152. Glossar	163
153. Index	164
154. Bibliographie	165
155. Anlagen	166
156. Glossar	167
157. Index	168
158. Bibliographie	169
159. Anlagen	170
160. Glossar	171
161. Index	172
162. Bibliographie	173
163. Anlagen	174
164. Glossar	175
165. Index	176
166. Bibliographie	177
167. Anlagen	178
168. Glossar	179
169. Index	180
170. Bibliographie	181
171. Anlagen	182
172. Glossar	183
173. Index	184
174. Bibliographie	185
175. Anlagen	186
176. Glossar	187
177. Index	188
178. Bibliographie	189
179. Anlagen	190
180. Glossar	191
181. Index	192
182. Bibliographie	193
183. Anlagen	194
184. Glossar	195
185. Index	196
186. Bibliographie	197
187. Anlagen	198
188. Glossar	199
189. Index	200
190. Bibliographie	201
191. Anlagen	202
192. Glossar	203
193. Index	204
194. Bibliographie	205
195. Anlagen	206
196. Glossar	207
197. Index	208
198. Bibliographie	209
199. Anlagen	210
200. Glossar	211
201. Index	212
202. Bibliographie	213
203. Anlagen	214
204. Glossar	215
205. Index	216
206. Bibliographie	217
207. Anlagen	218
208. Glossar	219
209. Index	220
210. Bibliographie	221
211. Anlagen	222
212. Glossar	223
213. Index	224
214. Bibliographie	225
215. Anlagen	226
216. Glossar	227
217. Index	228
218. Bibliographie	229
219. Anlagen	230
220. Glossar	231
221. Index	232
222. Bibliographie	233
223. Anlagen	234
224. Glossar	235
225. Index	236
226. Bibliographie	237
227. Anlagen	238
228. Glossar	239
229. Index	240
230. Bibliographie	241
231. Anlagen	242
232. Glossar	243
233. Index	244
234. Bibliographie	245
235. Anlagen	246
236. Glossar	247
237. Index	248
238. Bibliographie	249
239. Anlagen	250
240. Glossar	251
241. Index	252
242. Bibliographie	253
243. Anlagen	254
244. Glossar	255
245. Index	256
246. Bibliographie	257
247. Anlagen	258
248. Glossar	259
249. Index	260
250. Bibliographie	261
251. Anlagen	262
252. Glossar	263
253. Index	264
254. Bibliographie	265
255. Anlagen	266
256. Glossar	267
257. Index	268
258. Bibliographie	269
259. Anlagen	270
260. Glossar	271
261. Index	272
262. Bibliographie	273
263. Anlagen	274
264. Glossar	275
265. Index	276
266. Bibliographie	277
267. Anlagen	278
268. Glossar	279
269. Index	280
270. Bibliographie	281
271. Anlagen	282
272. Glossar	283
273. Index	284
274. Bibliographie	285
275. Anlagen	286
276. Glossar	287
277. Index	288
278. Bibliographie	289
279. Anlagen	290
280. Glossar	291
281. Index	292
282. Bibliographie	293
283. Anlagen	294
284. Glossar	295
285. Index	296
286. Bibliographie	297
287. Anlagen	298
288. Glossar	299
289. Index	300
290. Bibliographie	301
291. Anlagen	302
292. Glossar	303
293. Index	304
294. Bibliographie	305
295. Anlagen	306
296. Glossar	307
297. Index	308
298. Bibliographie	309
299. Anlagen	310
300. Glossar	311
301. Index	312
302. Bibliographie	313
303. Anlagen	314
304. Glossar	315
305. Index	316
306. Bibliographie	317
307. Anlagen	318
308. Glossar	319
309. Index	320
310. Bibliographie	321
311. Anlagen	322
312. Glossar	323
313. Index	324
314. Bibliographie	325
315. Anlagen	326
316. Glossar	327
317. Index	328
318. Bibliographie	329
319. Anlagen	330
320. Glossar	331
321. Index	332
322. Bibliographie	333
323. Anlagen	334
324. Glossar	335
325. Index	336
326. Bibliographie	337
327. Anlagen	338
328. Glossar	339
329. Index	340
330. Bibliographie	341
331. Anlagen	342
332. Glossar	343
333. Index	344
334. Bibliographie	345
335. Anlagen	346
336. Glossar	347
337. Index	348
338. Bibliographie	349
339. Anlagen	350
340. Glossar	351
341. Index	352
342. Bibliographie	353
343. Anlagen	354
344. Glossar	355
345. Index	356
346. Bibliographie	357
347. Anlagen	358
348. Glossar	359
349. Index	360
350. Bibliographie	361
351. Anlagen	362
352. Glossar	363
353. Index	364
354. Bibliographie	365
355. Anlagen	366
356. Glossar	367
357. Index	368
358. Bibliographie	369
359. Anlagen	370
360. Glossar	371
361. Index	372
362. Bibliographie	373
363. Anlagen	374
364. Glossar	375
365. Index	376
366. Bibliographie	377
367. Anlagen	378
368. Glossar	379
369. Index	380
370. Bibliographie	381
371. Anlagen	382
372. Glossar	383
373. Index	384
374. Bibliographie	385
375. Anlagen	386
376. Glossar	387
377. Index	388
378. Bibliographie	389
379. Anlagen	390
380. Glossar	391
381. Index	392
382. Bibliographie	393
383. Anlagen	394
384. Glossar	395
385. Index	396
386. Bibliographie	397
387. Anlagen	398
388. Glossar	399
389. Index	400
390. Bibliographie	401
391. Anlagen	402
392. Glossar	403
393. Index	404
394. Bibliographie	405
395. Anlagen	406
396. Glossar	407
397. Index	408
398. Bibliographie	409
399. Anlagen	410
400. Glossar	411
401. Index	412
402. Bibliographie	413
403. Anlagen	414
404. Glossar	415
405. Index	416
406. Bibliographie	417
407. Anlagen	418
408. Glossar	419
409. Index	420
410. Bibliographie	421
411. Anlagen	422
412. Glossar	423
413. Index	424
414. Bibliographie	425
415. Anlagen	426
416. Glossar	427
417. Index	428
418. Bibliographie	429
419. Anlagen	430
420. Glossar	431
421. Index	432
422. Bibliographie	433
423. Anlagen	434
424. Glossar	435
425. Index	436
426. Bibliographie	437
427. Anlagen	438
428. Glossar	439
429. Index	440
430. Bibliographie	441
431. Anlagen	442
432. Glossar	443
433. Index	444
434. Bibliographie	445
435. Anlagen	446
436. Glossar	447
437. Index	448
438. Bibliographie	449
439. Anlagen	450
440. Glossar	451
441. Index	452
442. Bibliographie	453
443. Anlagen	454
444. Glossar	455
445. Index	456
446. Bibliographie	457
447. Anlagen	458
448. Glossar	459
449. Index	460
450. Bibliographie	461
451. Anlagen	462
452. Glossar	463
453. Index	464

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Aufgabenstellung	12
Ergebnisse	13
I. Eigenschaften von Chondrocyten in Kultur	13
1. Hühnerchondrocyten aus Sterna Kalbschondrocyten aus Gelenkknorpel	
2. Suspensionskultur - Monolayerkultur	14
3. Morphologische Eigenheiten	15
4. Beobachtungen mit der Immunfluoreszenz	17
5. Biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung des Kollagens	17
Zusammenfassung	25
II. Untersuchungen zum "Status" dedifferenzierter Chondrocyten: "Fibroblast" oder "Chondrocyt"?	26
1. Vergleich zwischen primären Chondrocyten und Fibroblasten	26
1.1 Chondrocyten und Fibroblasten in Sus- pensionskultur - Einfluß von Aktinomycin C	26
1.2 Reaktion auf Erhöhung der Kulturtemperatur	28
1.3 Einfluß von Prokollagenpeptid (Col 1) von Typ I Kollagen auf die Kollagenbiosynthese	29
2. "Dedifferenzierte" Chondrocyten im Vergleich zu "primären" Chondrocyten und Fibroblasten	31
2.1 Morphologische Beobachtungen	31
2.2 Wachstumsverhalten	31
2.3 Einbau von radioaktivem Prolin und Synthese von Kollagen	35
2.4 "Resuspension" von Monolayerkulturen	36
2.5 Beziehung von Synthese zu Degradation	39
2.6 Bindung von Concanavalin A - Ausdruck von Rezeptoreneigenschaften der Zelloberfläche	40
Zusammenfassung	43

III. Untersuchung zur Beschleunigung der "Dedifferenzierung"	44
1. Zusatz von Aktinomycin C als Transkriptions- hemmer	45
2. Umschalten der Kollagenbiosynthese unter Kulturbedingungen, die Proliferation und intrazelluläre Degradation beeinflussen	49
3. Kollagenbiosynthese von Chondrocyten unter dem Einfluß konditionierter Medien	54
Zusammenfassung	61
Diskussion	62
Zusammenfassung	79
Material und Methoden	81
Literaturverzeichnis	93

Abkürzungen

ASA	Aminosäuren Analyse
α	monomere Polypeptidketten des Kollagens
β	Dimer aus zwei α -Ketten
γ	Trimer aus drei α -Ketten
BAPN	β -Aminopropionitril
BUDR	Bromdeoxyuridin
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-monophosphat
ChKm	Chondrocyten konditioniertes Medium
CKM	Calvarien konditioniertes Medium
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
Con A	Concanavalin A
cpm	Impulse/min
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
FKM	Fibroblasten konditioniertes Medium
FKS	Foetales Kälberserum
LRHK	Lathyritisches Rattenhautkollagen
MG	Molekulargewicht
ML	Monolayer
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PPO	Diphenyloxazol
SDS	Sodiumdodecysulfat
SKM	Sterna konditioniertes Medium
TCA	Trichloressigsäure

E I N L E I T U N G

Physiologische Funktionen und damit verbunden biomechanische Eigenschaften verschiedener Bindegewebsformen sind so breit gefächert, daß ihre gemeinsame Wurzel als mesenchymales Gewebe kaum erkennbar ist. Knochen zeichnen sich durch Festigkeit und Härte aus, Sehnen als seilartige Gebilde übertragen die Kraft der Muskeln, die Haut ist flexibel und zäh, während Knorpel stoßdämpfende Eigenschaften besitzt. Diese Vielfalt an Gestalt und Funktion erzielt der Organismus durch ein ausgewogenes Nebeneinander der jeweils gewebespezifischen Zellen, von fasrigen Elementen sowie von sogenannter amorpher Grundsubstanz (Abb. 1).

Gewebe-Aufbau

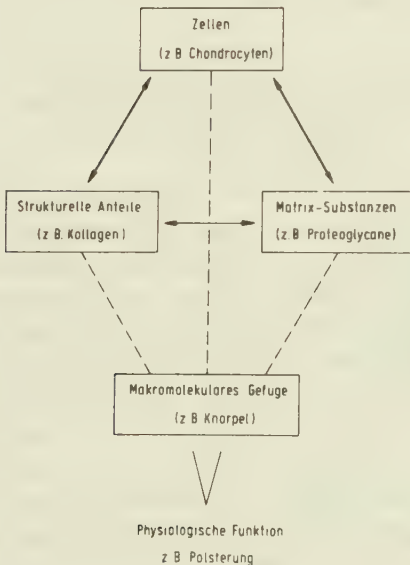


Abb. 1

Schematische Darstellung des Aufbaus eines Bindegewebes (Knorpel). Zwischen den Zellen und den von ihnen synthetisierten Strukturproteinen und Grundsubstanz bestehen wechselseitige Beziehungen, die ein funktionelles Gewebe erfordert.

Die Wechselwirkung ist dynamisch und statisch zugleich und betrifft Synthese und Degradation. Wie ein metastabiles Gleichgewicht kann das Gewebe durch eine Störung in einen anderen (pathologischen) Zustand versetzt werden.

Jede sich an der Biologie orientierende Erforschung des Bindegewebes wendet sich ganz selbstverständlich zuerst den Produktionseinheiten, den Zellen, zu, um danach den "Wandel" ihrer Produkte vom Ort der Synthese bis zum eigentlichen Funktionsbereich zu verfolgen.

I. Kollagensynthetisierende Zellen

Alle Bindegewebszellen sind mesenchymalen Ursprungs und entwickeln sich im Lauf der Ontogenese eines Individuums aus unspezifischen, pluripotenten Mesodermzellen (Abb. 2).

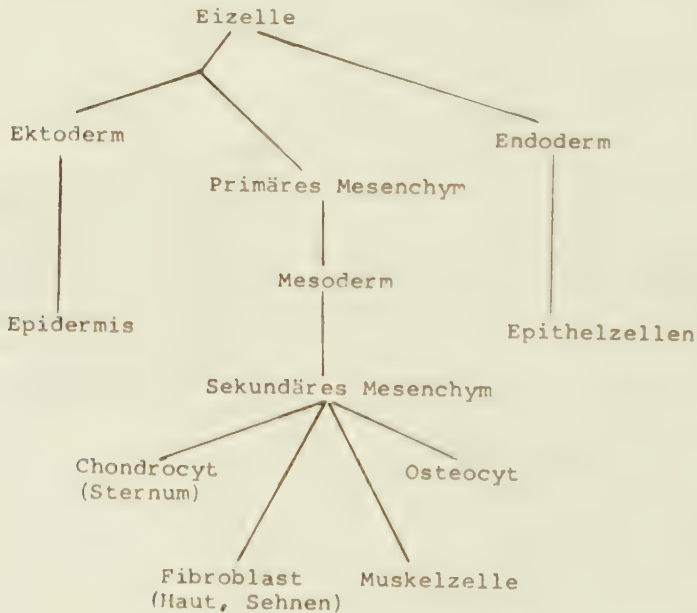


Abb. 2

Embryonaler Ursprung der verwendeten Bindegewebszellen aus dem Huhn (modifiziert nach Hay (1))

Dieser Vorgang der Differenzierung bringt es mit sich, daß die Gestalt einer Zelle sowie ihre Genprodukte von Zelltyp zu Zelltyp und von Gewebe zu Gewebe variieren. Während Fibroblasten spindelförmig und mobil sind, zeichnen sich Chondrocyten durch ihre runde Form, sowie durch Ablagerung einer starklichtbrechenden, extrazellulären Matrix aus. Zellen der glatten Muskulatur sind in ihrer Form den Fibroblasten sehr ähnlich, doch zusätzlich ist ihre Oberfläche durch Filopodien stark zerlappt. Osteoblasten, die Zellen der Knochen, weisen polygonale Formen auf. Qualität und Quantität der Zellprodukte sind charakteristisch für die verschiedenen Zelltypen und garantieren damit, daß ein bestimmtes Gewebe bestmöglich an die gewünschte physiologische Funktion angepaßt ist. Einer Regulation der Synthese ist nicht nur die Masse der amorphen Grundsubstanz, der Proteoglykane, unterworfen, sondern auch das bindegewebspezifische Kollagen. Seinem Auftreten als polymorphes Protein in einer Reihe genetisch verschiedener Typen sollen die Untersuchungen dieser Arbeit gelten.

II. Regulation des Syntheseablaufs in kollagen-synthetisierenden Zellen

a) Auswahl des Kollagentyps und der Menge

Wie in Abb. 3 schematisch dargestellt, kann aus einer undifferenzierten, mesenchymalen Zelle z.B. ein Fibroblast entstehen, der auf die Synthese von Typ I und Typ III Kollagen festgelegt ist, und in dem sowohl das Verhältnis der beiden Kollagentypen zueinander als auch deren absolute Menge einer strikten Kontrolle unterworfen sind. Wie ebenfalls in Abb. 3 zu sehen ist, kann sich aber aus derselben Stammzelle ein Chondrocyt entwickeln, in dem von den vorhandenen kollagencodierenden Genen nur das Gen dereprimiert vorliegt, das für die Synthese für Typ II Kollagen die Matritze liefert (2).

Regulation der Genexpression

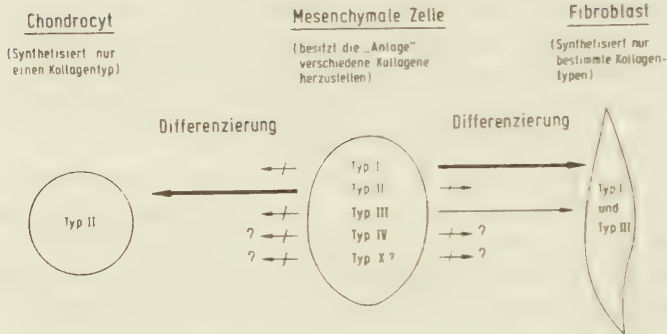


Abb. 3

Differenzierungsmöglichkeit einer mesenchymalen Zelle am Beispiel der Kollagensynthese. Die undifferenzierte, mesenchymale Zelle besitzt die Potenz zur Synthese aller Kollagentypen. Von den möglichen für Kollagen codierenden Genen sind im Fibroblast nur die für Typ I und III dereprimiert, im Chondrocyt das für Typ II Kollagen.

Insgesamt sind bisher 5 verschiedene Kollagentypen gefunden worden, deren Molekularzusammensetzung und Vorkommen in Tabelle 1 zusammengefaßt sind (3, 4, 5). Die Kollagenketten besitzen eine homologe Aminosäuresequenz, deren auffallendste Eigenschaft wohl darin zu sehen ist, daß jede dritte Aminosäure Glycin darstellt, eine Voraussetzung für den Aufbau der typischen Kollagenstruktur (siehe Abschnitt c). Im Augenblick muß die Frage offen bleiben, welche gewebespezifischen Funktionen an das Vorhandensein eines Kollagentyps gebunden sind.

Tabelle 1: Kollagenpolymorphismus (nach 3)

Molekülzusammensetzung, hauptsächlichliches Vorkommen und einige charakteristische Merkmale

Kollagentyp	Vorkommen	Molekülzu- sammensetzung	Verhältnis Hyp / Pro	Verhältnis Hyl / Lys	Kohlenhydrat ⁺ %
I	Haut, Sehnen, Knochen	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$	0.6	0.23	0.5
II	Knorpel	$[\alpha_1(II)]_3$	0.7	1.5	10
III	foetale Ge- webe, Haut, Gefäße, Reticulum	$[\alpha_1(III)]_3$	1.2	0.17	0.5
IV	Glaskörper, Glomeruli, Basalmembran	$[\alpha_1(IV)]_3$	2.1	4.5	12
V	Placenta, Haut	A (B) ₂	0.98	1.73	?

⁺) Gewichtsprozent

b) Regulation der Modifizierungen der Kollagenketten
während und im Anschluß an die Translation

Eine Besonderheit der Kollagenbiosynthese ist darin zu sehen, daß die Kollagenketten nur dann ihre funktions-
gerechte Form einnehmen können, wenn sie eine Serie von
enzymatischen Modifikationen durchlaufen haben (siehe Abb. 4)
(4, 5, 6, 7).

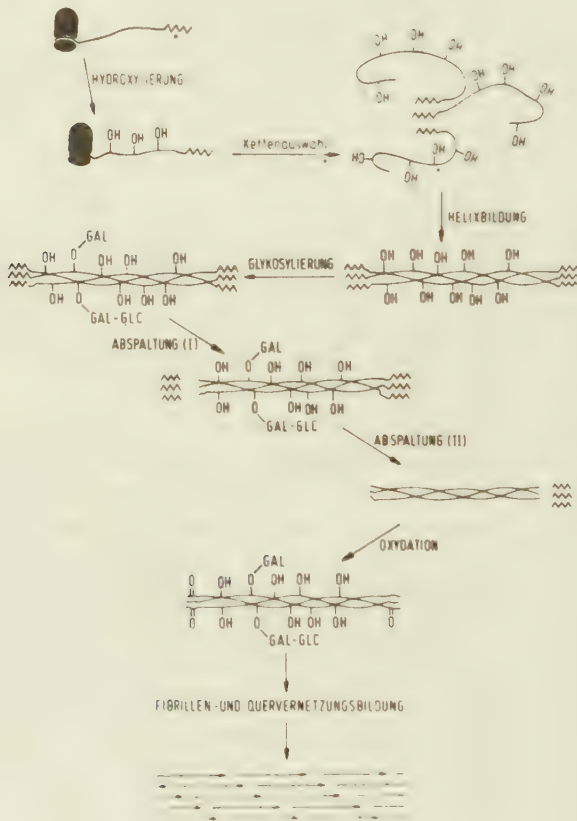


Abb. 4

Co- und posttranslationale Modifikationen während
der Biosynthese des Kollagens

Wie alle zur Sekretion aus der Zelle bestimmten Proteine, so wird auch Kollagen als Vorstufe synthetisiert, deren pro- α -Ketten zusätzliche Peptide sowohl am aminoterminalen, als auch am carboxyterminalen Ende besitzen (6 - 10). Diese Prokollagenpeptide sind zum größten Teil in einer globulären Konformation und enthalten mit Tryptophan eine Aminosäure, die im helikalen Teil des Kollagenmoleküls nicht gefunden wird.

Die an den Polyribosomen wachsenden Peptidketten werden an den Prolin- und Lysinresten in Y - Position des Triplets Gly - X - Y hydroxyliert, wobei Hydroxyprolin zur Stabilität der Tripelhelix und Hydroxylysin zur Stabilität der Quervernetzung beiträgt. In einem nächsten Schritt werden von Glycosyltransferasen an einige Hydroxylysinreste Zuckerreste übertragen (Galaktose, Glucose). Gleich anschließend müssen die Peptidketten in typspezifischer Weise zusammenfinden (Kettenauswahlprozeß) und ins richtige Register gebracht werden ("molecular assembly") (11).

Auf dem Transport in den extrazellulären Raum erfolgt die Umwandlung des Prokollagens zum eigentlichen Kollagenmolekül (12). Die Moleküle lagern sich durch 1/4 Verschiebung zu fibrillären Strukturen zusammen, die sich nach Oxidation von Lysin- und Hydroxylysinresten durch spontane Ausbildung von Quervernetzungen stabilisieren können. Diese Kollagenfibrillen stellen die im Bindegewebe vorliegende Funktionsform dar, und sind im Elektronenmikroskop an einem charakteristischen Querstreifungsmuster erkennbar (Abb. 5) (3, 13).

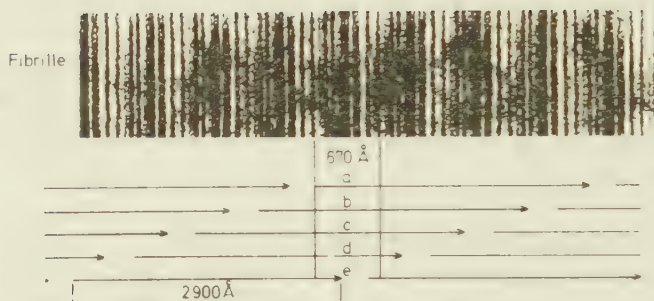


Abb. 5

Aufbau einer Kollagenmikrofibrille

Die elektronenmikroskopische Aufnahme von Typ I Kollagen nach positiver Anfärbung mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure zeigt ein charakteristisches Querstreifungsmuster mit einer Identitätsperiode von 670 Å. Darunter Anordnung der Kollagenmoleküle (2 900 Å) in der Fibrille in Viertelversetzung.

c) Molekularer Aufbau des Kollagens und seine Struktur

Das Kollagenmolekül, als letztes Glied der Synthesekette und als Grundeinheit der Kollagenfibrille, besitzt bei allen bisher bekannten Typen eine ganz ähnliche Struktur. Es hat eine Länge von 2 900 Å und einen Durchmesser von 14 Å und ist aus drei Polypeptidketten, den α - Ketten, aufgebaut. Jede Kette zählt circa 1 000 Aminosäuren, die zu einer linksdrehenden Spirale aufgedreht ist. Drei dieser Helices sind zu einer Rechtsschraube verwunden, dem trimeren Molekül. Diese charakteristische Tertiär- bzw. Quartärstruktur ist durch die Aminosäuresequenz bedingt. Jede dritte Position ist mit Glycin besetzt, was zu einer Aneinanderreihung der Triplets Gly - X - Y führt, wobei X vielfach ein Prolin, Y ein Hydroxyprolin darstellt.

Glycin in jeder 3. Position ist essentielle Voraussetzung für die Ausbildung einer Tripelhelix und der Gehalt an Aminosäuren beeinflusst die Stabilität der helikalen Struktur. An den N und C terminalen Enden finden sich Sequenzabschnitte mit geringerem Glycingehalt, was zur Auflösung der tripelhelikalen Struktur führt (10, 14). Die Anlagerung der tripelhelikalen Moleküle an schon bestehende Kollagenfibrillen wird durch die Zusammenlagerung polarer und hydrophober Aminosäuren gesteuert ("self assembly") und durch Quervernetzung stabilisiert.

Durch Zugabe von ATP zu monomeren Kollagenlösungen kann man erzwingen, daß sich die Kollagenmoleküle parallel und mit den Enden abschließend aneinanderlagern (Abb. 6).

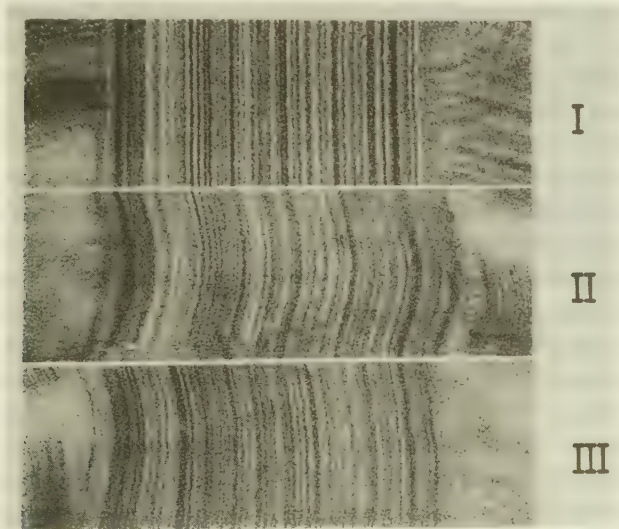


Abb. 6

SLS Kristallite von Typ I, II und III Kollagen nach Dialyse gegen ATP und Anfärbung mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der SLS Kristallite verschiedener Kollagentypen zeigen eine typspezifische Querstreifung, die die Verteilung polarer Aminosäuren entlang des Moleküls widerspiegelt.

Die Long - spacing - segment (SLS) Kristallite spiegeln nach Anfärbung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat nicht nur die Verteilung polarer Aminosäuren entlang des Moleküls wider, sondern erlauben auch die Länge des Kollagenmoleküls abzuschätzen (3, 13).

III. Änderung der Genexpression

a) Pathologische Bedingungen

Während der gesunde Organismus einen solchen Differenzierungszustand erreicht, daß individuelle Gewebe optimal an die Erfordernisse angepaßt erscheinen, sind in den letzten Jahren pathologische Fehlverhalten von Bindegewebsformen auf Störungen in der Regulation der für Kollagen codierenden Gene zurückgeführt worden (15, 16, 17). Während als Beispiel einer qualitativen Veränderung die Osteogenesis imperfecta mit einer verhältnismäßig hohen Synthese von Typ III Kollagen (18, 19), sowie das Marfansyndrom mit einem Mangel an Typ I Kollagen Erwähnung finden sollen (20), ist die Sklerodermie durch eine signifikante Erhöhung der absoluten Kollagenmenge charakterisiert (20, 21). In diesen, zumeist genetisch bedingten Erkrankungen wird offensichtlich in einem bestimmten Gewebe der falsche Kollagentyp oder eine untaugliche Menge Kollagens synthetisiert, und induziert damit die physiologischen Fehlfunktionen (22).

Als Beispiel für eine Änderung der Genexpression verschieden differenzierter Zellen wird die Wundheilung und Regeneration betrachtet. Nach der Verletzung eines Gewebes beobachtet man eine "Umdifferenzierung" von verschiedenen differenzierten Zellen zu einer undifferenzierten, Kollagen Typ I synthetisierenden Zelle und eine anschließende Redifferenzierung.

b) Experimentelle Bedingungen

Im Lauf der Differenzierung können sich Zellen ihren sich ändernden Umweltbedingungen durch adäquate Änderung in der Genexpression anpassen. Dabei kann z.B., wie oben beschrieben, eine mesenchymale Zelle ihre Typ I Synthese auf Typ II Kollagen umschalten, um ein Knorpelgewebe aufzubauen. Die Änderung der Genexpression im Laufe der ontogenetischen Entwicklung stellt jedoch keinen irreversiblen Prozeß dar, vielmehr ein Einstellen eines metastabilen Gleichgewichts, dessen Erhalt, d.h. die Stabilität einer differenzierten Genaktivität, gewisser Umweltfaktoren bedarf. So ist es schon lange bekannt, daß Zellen aus ihrer physiologischen Umgebung herausgenommen und in vitro kultiviert, "dedifferenzieren" und dabei ihre Genexpression ändern.

Differenzierte Chondrocyten, die als matrixfreie, isolierte Zellen in geringer Dichte als Einzelschicht (Monolayer) kultiviert werden, erwiesen sich als günstiges System zur Untersuchung des Vorgangs der "Dedifferenzierung" (23 - 28). Dabei ändern die Zellen nicht nur ihr Wachstumsverhalten, sondern auch ihre Gestalt dahingehend, daß sie Fibroblasten ähnlich werden. Biochemische Untersuchungen zeigten, daß diese Zellen und ihre Teilprodukte auf die Synthese von Typ I Kollagen und ein anderes Proteoglycanmuster umschalten, welche beide für undifferenzierte, mesenchymale Zellen charakteristisch sind (29). Da die Zellen dichter Monolayerkulturen andererseits sich nicht "dedifferenzieren", aber in ihrer extrazellulären Matrix die auf die Genexpression stabilisierend wirkenden Faktoren bewahren können, wird die Wirkung der Zell-Matrix-Wechselwirkung für die Regulation der Genexpression diskutiert (30). Einen anderen Aspekt dazu bringt die Beobachtung, daß auch unter Bedingungen, die keine nennenswerte Proliferation zulassen, die Genexpression stabil ist (31 - 33). Anders ausgedrückt bedeutet das, daß bei der Differenzierung wie auch der Dedifferenzierung die Replikation der DNA und damit die Demaskierung der genetischen Information für die Änderung der Genexpression wesentlich zu sein scheint. In diesem Sinn ist der Begriff "Derepression" zu verstehen (34).

AUFGABENSTELLUNG

Ausgehend von dem bekannten Phänomen, daß Chondrocyten in vitro instabil in ihrer Genexpression sind, sollte versucht werden, im in vitro Kultursystem die Regulation der differenziellen Genaktivität zu untersuchen.

1. Das Umschalten der Kollagensynthese als Markerprozeß dedifferenzierender Chondrocyten und seine Abhängigkeit von anderen physiologischen Parametern sollte qualitativ und quantitativ beschrieben werden.
2. Vergleichende Untersuchungen sollten Aufschluß über den "Status" dedifferenzierter Chondrocyt - ob Chondrocyt oder Fibroblast - geben.
3. Im Versuch, den Umschaltvorgang dedifferenzierender Chondrocyten zu beschleunigen, sollte durch Manipulation der äußeren Bedingungen eine gezielte Einflußnahme auf die Regulation differenzierter Gene unternommen werden.

E R G E B N I S S E

I. Eigenschaften von Chondrocyten in Kultur

1. Hühnerchondrocyten aus Sterna

Kalbschondrocyten aus Gelenkknorpel

Bei der Wahl der Kultursysteme für die Untersuchung des Dedifferenzierungsprozesses ist entscheidend, daß foetale, zellreiche Gewebe in ausreichendem und reproduzierbarem Maß und in vergleichbarer Entwicklungsstufe zur Verfügung stehen. Wesentlich ist jedoch auch, daß die im Organ enthaltenen Zellen eine möglichst "reine" Chondrocytenpopulation darstellen, und nicht durch Fibroblasten "kontaminiert" sind, die durch ihre höhere Teilungsrate bei einer Langzeitkultur die Chondrocyten überwachsen würden (35). So wurde Wert darauf gelegt, die Fibroblasten schnell und umfassend abzutrennen.

Die Sterna 17 Tage alter Hühnerembryonen werden durch Behandlung mit einem Collagenase/Trypsin Gemisch von dem umgebenden Perichondrium befreit. Damit liegt ein Gewebe vor, das nur noch Chondrocyten enthält, welche durch fortgesetzte Collagenasebehandlung als Einzellsuspension gewonnen werden können.

Gelenkknorpel vom foetalen Kalb enthält im Organ ungefähr 3 % Fibroblasten, die nach Desaggregation mit Collagenase die Chondrocytensuspension "kontaminieren" (36). Da die Fibroblasten sich schneller (nach circa 2 h) an der Oberfläche der Kulturschale festsetzen, können die schlecht anhaftenden Chondrocyten in ein zweites Gefäß transferiert werden. Wiederholt man diese Prozedur, so kann man sicher sein, daß man eine einheitliche Chondrocytenpopulation gewinnen kann. Nach weiteren 4 - 6 h setzen sich auch

Chondrocyten ab und lassen sich über Wochen als Monolayer kultivieren. Die Einheitlichkeit der Zellpopulation sowohl von Huhn als auch von Kalb wird mit Hilfe typspezifischer Antikörper kontrolliert.

2. Suspensionskultur - Monolayerkultur

Abb. 7 zeigt eine schematische Zusammenfassung der Kultivationsmöglichkeiten, die zur Verfolgung der Änderung der Genexpression und insbesondere der Kollagenbiosynthese besonders geeignet scheinen.

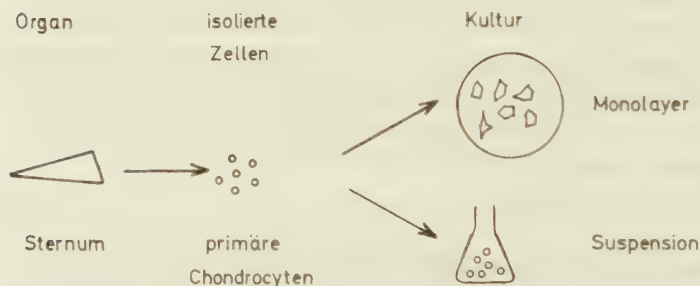


Abb. 7

Schematische Darstellung der Kultivationsmöglichkeiten der Zellen als Monolayer und in Suspension

In Suspensionskultur werden die Zellen ($10^5 - 10^6$ Zellen/ml) mit 5 % CO_2 /95 % Luft begast und bei 37° im Schüttelwasserbad kultiviert. Während Fibroblasten unter diesen Bedingungen ihre Teilungsfähigkeit nahezu vollständig verlieren und ihre Stoffwechselaktivität bereits nach 24 h fast eingebüßt haben, lassen sich Chondrocyten unter denselben Bedingungen 1 - 2 Wochen stoffwechselaktiv halten. Dabei beobachtet man allerdings, daß sich die Chondrocyten zu Aggregaten zusammenklumpen und dabei unter Erhalt ihres Differenzierungszustandes organähnliche Eigenschaften gewinnen. In Suspensionskultur beträgt der Anteil des Kollagens

ungefähr 30 % des Gesamtproteins. Da man in Suspension unter normalen Bedingungen kein Umschalten beobachten kann, wurde das Monolayerkultursystem zur Untersuchung der "Dedifferenzierung" gewählt.

Bei der Kultivierung der Chondrocyten in Monolayer spielt die Zelldichte bei der Aussaat eine wesentliche Rolle für das Umschalten. Konfluent ausgesäte Monolayer zeigen auch nach längerer Kultur keine Anzeichen einer "Dedifferenzierung", dagegen Zellen, die in einer Dichte ausgesät waren, die noch einige Zellteilungen zuließ (31). Aus diesem Grund werden zur Monolayerkultur 10^6 Zellen in einer Petrischale mit 10 cm Ø ausgesät und im Brutschrank bei 37° und unter 5 % CO_2 /95 % Luft gehalten. Das Medium wird alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die an der Oberfläche anhaftenden Zellen beginnen recht bald sich zu teilen. Außerdem beobachtet man einen stetigen Prozeß der "Dedifferenzierung" sowie ein Einpendeln der Kollagensynthese auf etwa 5 % vom Gesamtprotein.

3. Morphologische Eigenheiten

Während Chondrocyten und Fibroblasten in Suspension eine ähnliche, kugelförmige Gestalt einnehmen, unterscheiden sich diese Zelltypen recht auffallend, sobald ihnen die Gelegenheit gegeben wird, sich an Oberflächen festzusetzen und als Monolayer zu wachsen. Wie in Abb. 8 erkennbar ist, nehmen Fibroblasten eine gestreckte, spindelförmige Morphe an (a); frisch isolierte Chondrocyten hingegen sind polygonal und erscheinen insgesamt heteromorpher (b). Fibroblasten behalten ihre charakteristische Form auch während der Subkultivation bei. Chondrocyten gewinnen mehr und mehr fibroblastoide Gestalt, wenn sie längere Zeit in Monolayerkultur gehalten werden (c).

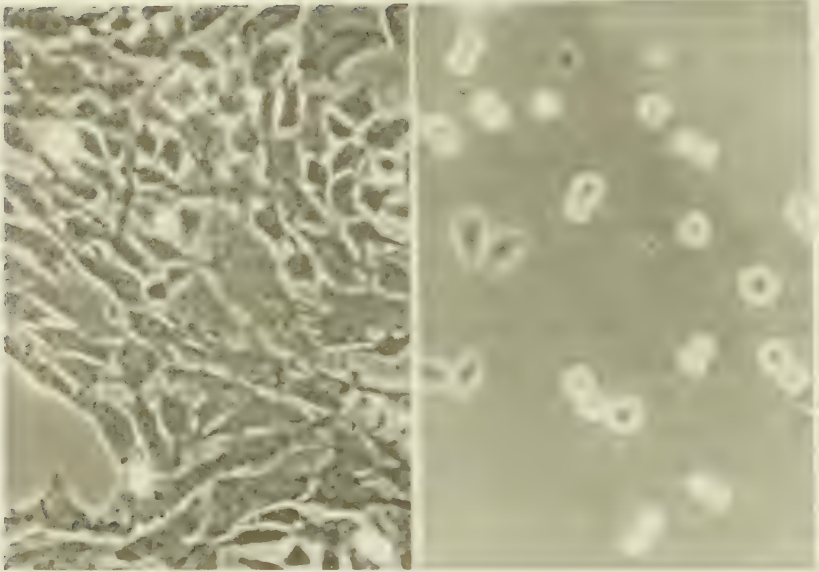


Abb. 8

Phasenkontrastaufnahmen von Zellen, die in einer Dichte von $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ in Petrischalen ausgesät wurden.

- a) Hühnerfibroblasten (7 Tage ML Kultur) zeigen die typische spindelförmige Gestalt.
- b) Hühnerchondrocyten (2 Tage ML Kultur) sind meist noch rund und von einer starklichtbrechenden Matrix umgeben.
- c) Hühnerchondrocyten (10 Tage ML Kultur). Alle Zellen haben sich abgesetzt und geteilt und zeigen ein epitheloides Wachstumsmuster.



4. Beobachtungen mit der Immunfluoreszenztechnik

Diese Technik erlaubt es mit Hilfe von typspezifischen Antikörpern auf der Ebene der einzelnen Zelle als auch des Zellrasens qualitative Veränderungen im Kollagensynthesemuster festzustellen (38). In Suspensionskultur, sowie zu Beginn der Monolayerkultur synthetisieren die Zellen Typ II Kollagen (Abb. 9a). Die sich teilenden Zellen in Monolayer gehen nach und nach auf die Synthese von Typ I Kollagen über, wobei vor allem die mobileren, fibroblastoiden Zellen reichlich Typ I Kollagen synthetisieren, das sich als Faserbündelnetz über die Zellen hinzieht (Abb. 9b). Nach 4 Wochen in Monolayerkultur läßt sich bei Hühnerchondrocyten nur noch Typ I Kollagen nachweisen. Neben der Typ I Kollagensynthese konnte bei Kalbschondrocyten auch eine Typ III Synthese festgestellt werden (Abb. 9 c).

5. Biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung des Kollagens

Die qualitativen Aussagen, die mit der Immunfluoreszenz erzielt wurden, lassen sich mit biochemischen Methoden auf quantitativer Ebene weiter erhärten. Dabei wurden einmal die Syntheseleistung der Zellen durch den Einbau von radioaktivem Prolin in Gesamtprotein und Kollagen ermittelt, und zum anderen quantitative Verschiebungen im Verhältnis der Kollagentypen zueinander erfaßt. Wie in Abb. 10 skizziert, wurden Chondrocyten aus Sterna embryonaler Hühner über 4 Wochen als Monolayer kultiviert. Am Ende jeder Woche wurden die Zellen trypsinisiert und danach auf zwei neue Petrischalen verteilt. Außerdem wurden am Ende jeder Woche 3 Petrischalen mit ^3H -Prolin markiert.

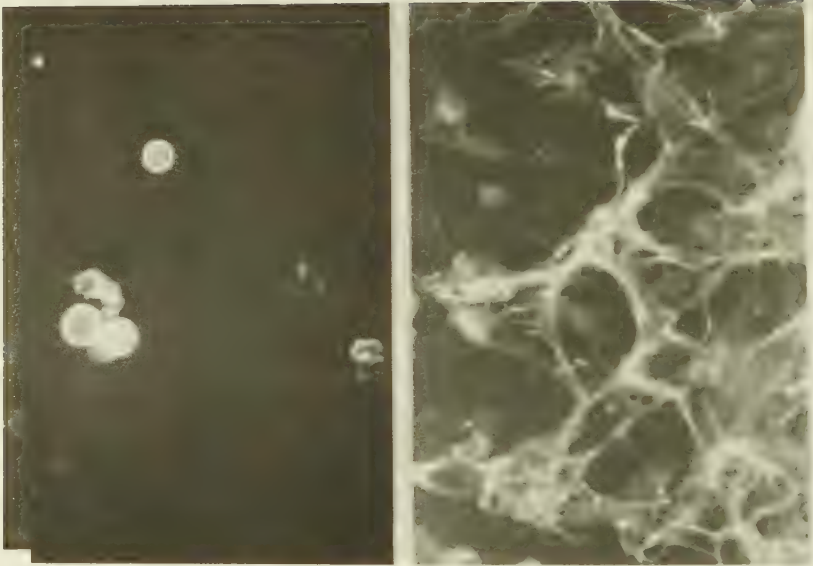


Abb. 9

Immunfluoreszenzaufnahmen

- a) einer mit Anti-Typ II Kollagen Antikörpern angefärbten Hühnerchondrocytensuspension
- b) eines mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen angefärbten Hühnerchondrocytenmonolayer (2 Wochen nach Aussaat)
- c) einer Kalbschondrocytenkultur, die mit Antikörpern gegen Typ III Kollagen angefärbt ist. Intrazelluläres Kollagen wird durch die Lufttrocknung der Zellen sichtbar gemacht. Auffallend die Größe der Kalbszellen im Vergleich zu Hühnerzellen.



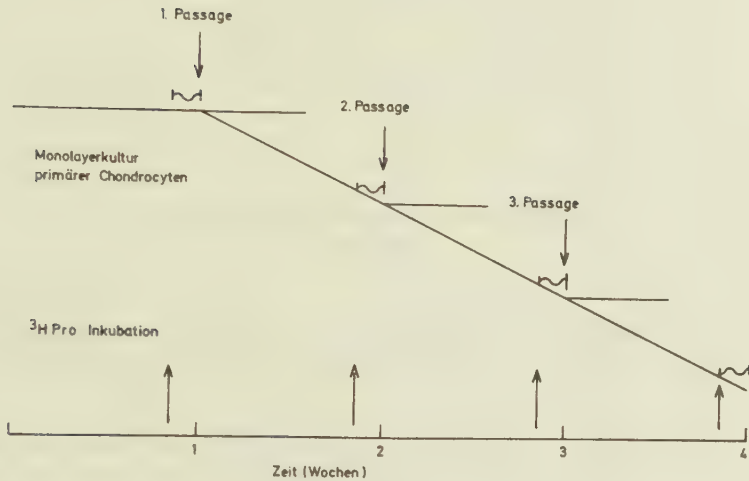


Abb. 10

Versuchsschema bei der Langzeitkultivierung von Hühnerchondrocyten in ML, die am Ende jeder Woche radioaktiv markiert und passagiert wurden.

~~~~~ 24 stündige Inkubationsphase mit  $^3\text{H}$ -Prolin.

Nach einer 24stündigen Inkubationsphase wurde das Kollagen mit Pepsin behandelt, um Prokollagen zu Kollagen umzuwandeln. Eine derartige Präparation wurde unter denaturierenden Bedingungen an Carboxymethyl-Cellulose chromatographiert. Wie Abb. 11 zeigt, ergibt sich bei der Chromatographie des Chondrocyten spezifischen Typ II Kollagens nur ein einziger Peak aus  $\alpha_1(\text{II})$ . "Dedifferenzieren" die Chondrocyten und schalten dabei auf die Synthese von Typ I Kollagen um, so tritt auch der für Typ I Kollagen charakteristische  $\alpha_2$  Peak auf (Abb. 11 b und c).

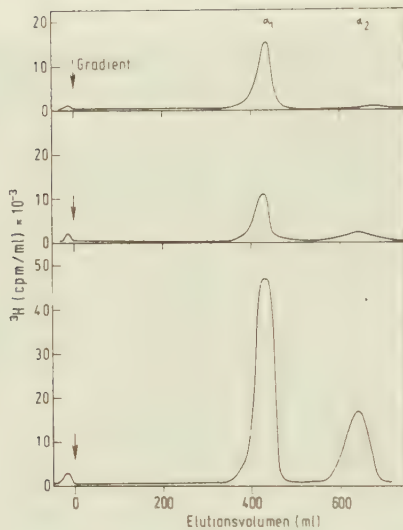


Abb. 11

CMC-Chromatogramme des Kollagens, das von Hühnerchondrocyten im Lauf der 4wöchigen Kultur synthetisiert wird.

- a 1 Woche nach Aussaat
- b 3 Wochen nach Aussaat
- c 4 Wochen nach Aussaat

Am Auftreten der  $\alpha_2$  - Kette läßt sich nach der Formel

$$\% \text{ Typ II} = \frac{\alpha_1/\alpha_2 - 2}{\alpha_1/\alpha_2 + 1} \times 100$$

der verbleibende Anteil von Typ II Kollagen ermitteln.

Wird dieses Verfahren auf oben geschilderte Kulturbedingungen angewandt, so ergibt sich eine "Kollagen-Umschalt-Kurve", wie sie in Abb. 12 dargestellt ist. Diese für Hühnerchondrocyten erhaltene Kurve zeigt, daß nach 4 Wochen praktisch kein Typ II Kollagen nachgewiesen werden kann und über denselben Zeitraum der Gesamtprolineinbau zunimmt. Die Umschaltung von Kalbschondrocyten erfolgt unter vergleichbaren Bedingungen etwas schneller.

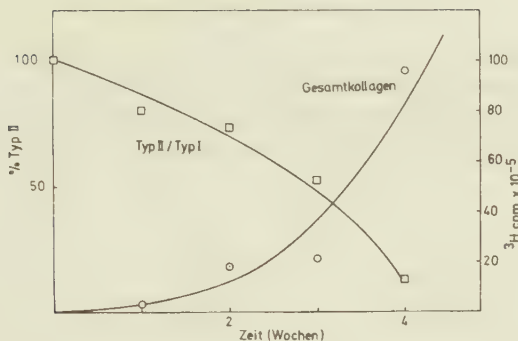


Abb. 12

Umschaltkurve und Gesamtkollagensynthese von Hühnerchondrocyten, die in einer Dichte von  $10^4/\text{cm}^2$  ausgesät waren und dreimal passagiert über 4 Wochen als ML kultiviert wurden.

Um auch biochemisch festzustellen, ob neben Typ I Kollagen auch Typ III beim Umschaltvorgang von Kalbschondrocyten synthetisiert wird, wurde das radioaktive Material, das im Bereich der  $\alpha_2$ -Kette chromatographiert, gesammelt, gefriergetrocknet und danach an einem Molekularsieb rechromatographiert. Bei der Chromatographie an Agarose A 5 werden die monomeren  $\alpha_2$ -Ketten des Typ I Kollagen von eventuell vorhandenen Trimeren des Typ III Kollagen abgetrennt (Abb. 13). Die Auswertung solcher Chromatogramme ist in Abb. 14 graphisch wiedergegeben und macht deutlich, daß die Synthese von Typ III Kollagen zeitlich später beobachtbar wird als die von Typ I Kollagen.

Bei der Syntheseumschaltung von Hühnerchondrocyten konnte mit der Immunfluoreszenztechnik auch Typ III Kollagen nachgewiesen werden, jedoch nicht biochemisch. Interessant war weiterhin die Beobachtung, daß dabei ein Kollagentyp auftritt, der bei Chromatographie an CM-Cellulose vor der  $\alpha_2$ -Kette eluiert (Typ III Kollagen von Huhn eluiert nach der  $\alpha_2$ -Kette (39)) und bei Chromatographie an Agarose oder bei Elektrophorese in Polyacryamidgelen, als  $\alpha$ -Kette identifiziert wurde.

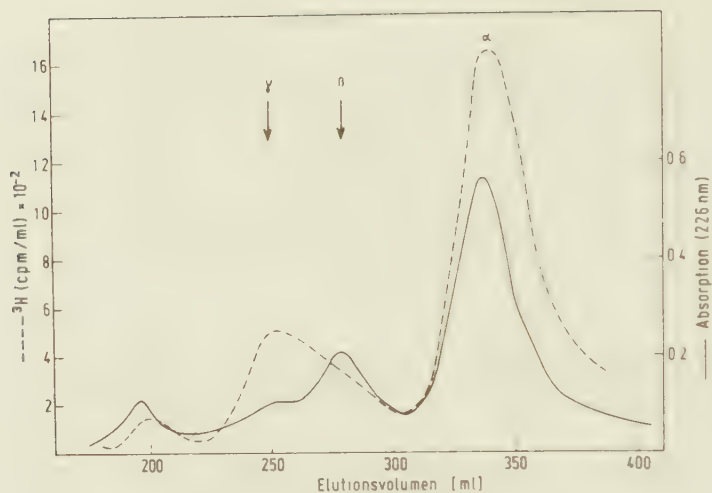


Abb. 13

#### Agarosechromatographie

Von einem CMC Chromatogramm wurde der  $\alpha_2$  Bereich des Kollagens, das Kalbschondrocyten nach 5wöchiger ML-Kultur synthetisiert, gesammelt, lyophilisiert und rechromatographiert.

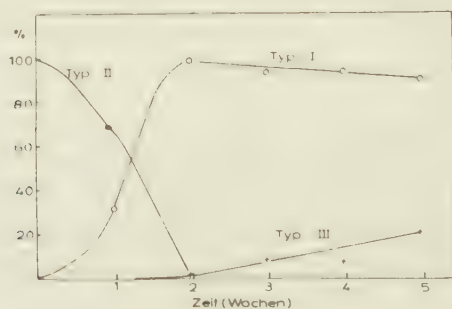


Abb. 14

Prozentuale Verteilung der Kollagentypen bei der 5wöchigen ML-Kultur von Kalbschondrocyten.

Das Verhältnis von Hyp zu Pro wurde für diese Kollagenketten mit 0.78 bestimmt und liegt mit diesem Wert im Bereich des Hydroxylierungsgrads von Typ I und Typ II Kollagen und weit unter dem von Typ III (siehe Tab. 1).

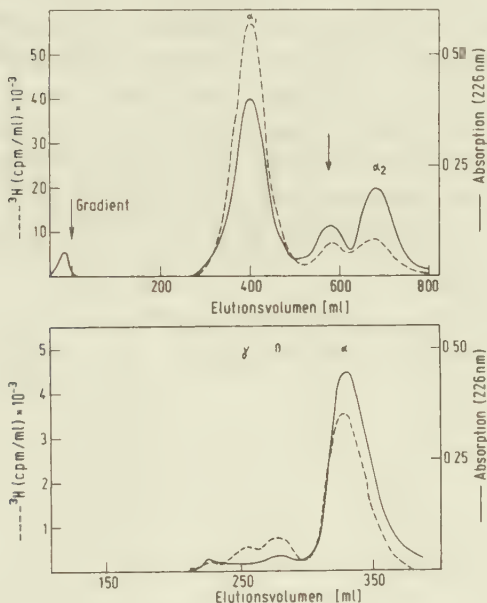


Abb. 15

CMC Chromatographie (oben) und Rechromatographie an Agarose (unten) des von umgeschalteten Hühnerchondrocyten synthetisierten Kollagens. Das an CMC mit  $\downarrow$  bezeichneter Stelle eluierende Material erwies sich am Molekularsieb als  $\alpha$ -Komponente.

Diese Untersuchungen boten auch die Möglichkeit nachzuweisen, daß neben dem Umschalten von Typ II Kollagen auf mindestens drei andere Kollagentypen der Anteil von Kollagen an Gesamtprotein einer Modulation unterworfen ist.

Zu diesem Zweck wurden entsprechend der Versuchsanordnung in Abb. 11 aliquote Anteile entnommen, intensiv dialysiert und nach Hydrolyse der Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin im nichtdialysablen Anteil bestimmt. Dabei wurde die Formel

$$\% \text{ Kollagen} = \frac{2 \times \text{cpm Hyp}}{(\text{cpm Pro} - \text{cpm Hyp}) \cdot 5 + 2 \text{ cpm Hyp}} \times 100$$

zugrunde gelegt, in der davon ausgegangen wird, daß die Iminosäuren Pro und Hyp ungefähr fünf mal so häufig im Kollagen vorkommen wie in anderen Proteinen (40, 41). Wie Abb. 16 zeigt, fällt der anfängliche hohe Kollagenanteil bei der Kultur von Kalbschondrocyten in Monolayerkultur ganz erheblich ab und steigt danach langsam wieder auf Werte an, die denen von Fibroblasten sehr ähnlich sind.

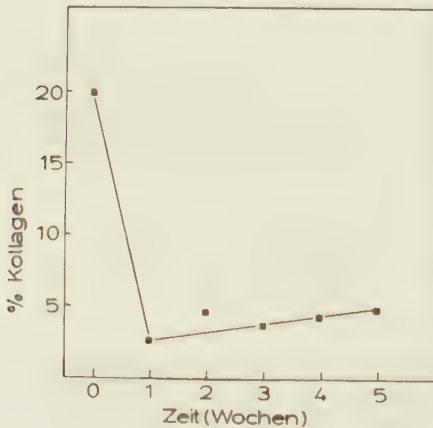


Abb. 16

Prozentualer Anteil des Kollagens am Gesamtprotein während der 5wöchigen ML Kultur von Kalbschondrocyten.

## Zusammenfassung der Ergebnisse des Teil I

Im ersten Teil der Arbeit sind Versuche dargestellt, die die Charakterisierung eines Systems erlauben, mit dem die Änderung der Genexpression näher untersucht werden kann. Bei der Ausarbeitung der Kulturbedingungen zeigte sich, daß eine geringe Zelldichte und das Verhindern der Synthese einer extrazellulären Matrix ein Umschalten erleichtert.

Matrixfreie Chondrocyten, die in Monolayerkultur über Wochen die Möglichkeit haben sich zu teilen, werden sowohl in ihrer Gestalt als auch in der Typ I Kollagensynthese Fibroblasten ähnlich. Daneben sind Kalbschondrocyten zur Synthese von Typ III Kollagen fähig, während in Hühnerchondrocyten ein neuer Typ nachgewiesen werden konnte. Während des Umschaltens nimmt der kollagene Anteil an Protein ab.

## II. Untersuchungen zum "Status" dedifferenzierter Chondrocyten: "Fibroblast" oder "Chondrocyt"?

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, stellen Chondrocyten in Bezug zur Synthese ihres zellspezifischen Typ II Kollagens ein labiles System dar; die neu induzierte Synthese von Typ I Kollagen ist ein spezifisches Produkt von Fibroblasten und Osteoblasten. Eine Teilaufgabe der Arbeit war daher, neben der Synthese von Typ I Kollagen umgeschaltete Chondrocyten in anderen Parametern mit Fibroblasten zu vergleichen. Zuvor erschien es notwendig, primäre Chondrocyten und Fibroblasten in ihrem unterschiedlichen Verhalten in Zellwachstum und Suspension zu untersuchen, um danach Veränderungen während der "Dedifferenzierung" der Chondrocyten in Vergleich dazu zu setzen.

### 1. Vergleich zwischen primären Chondrocyten und Fibroblasten

In den geschilderten Versuchen sollen 3 typisch unterschiedliche Eigenschaften von Fibroblasten und Chondrocyten dargestellt werden, nämlich das Verhalten in Suspension, die Wachstumsrate und die Regulation der Kollagenbiosynthese.

#### 1.1 Chondrocyten und Fibroblasten in Suspensionskultur - Einfluß von Aktinomycin

Für die Durchführung der Versuche im Teil III 1. schien es notwendig, Chondrocyten und Fibroblasten hinsichtlich ihres Verhaltens in Suspensionskultur sowie ihrer Empfindlichkeit gegenüber Aktinomycin C miteinander zu vergleichen. Über die Hemmung der Transkription durch Aktinomycin sollte versucht werden, Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der Typ I und II Kollagensynthese zu bekommen (42).

Frisch isolierte Hühnerzellen wurden 24 Stunden in Suspensionskultur gehalten, um den Zelloberflächen eine "Erholungsphase" zur Regeneration der Membranproteine zu gestatten. Danach wurde radioaktives Prolin zugesetzt und dessen Einbau in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Außerdem wurde jeweils einer Hälfte der suspendierten Zellen während der Pulszeit Aktinomycin C (5  $\mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt.

Abb. 17 zeigt, daß Chondrocyten ungefähr 10 mal mehr Prolin einbauen als Fibroblasten, und daß sie nach einer 8stündigen Pulszeit noch keinen Plateauwert erreicht haben, wie das bei den Fibroblasten der Fall ist. Der Einfluß des Aktinomycins macht sich bei Chondrocyten viel stärker bemerkbar, so daß die Einbauwerte nach 8 Stunden auf etwa 4 % absinken, während bei Fibroblasten immer noch ein Prolineinbau gefunden wird, der bei 20 % des nichtinhibierten Wertes liegt.

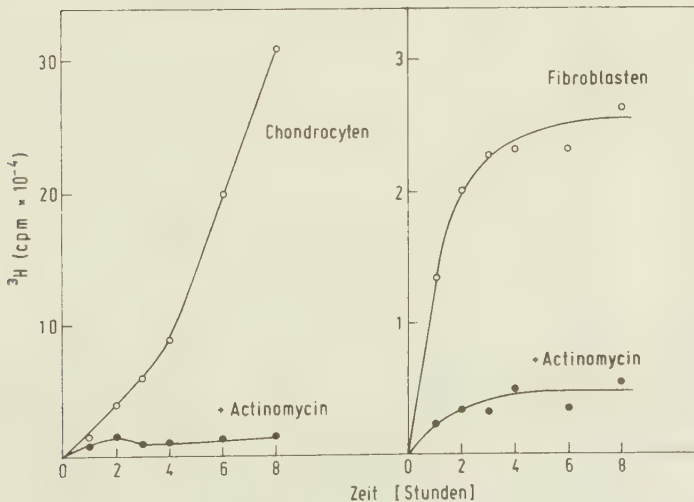


Abb. 17

$^3\text{H}$ -Prolineinbau in Hühnerchondrocyten und Fibroblasten in Suspension in An- (●-●-●) und Abwesenheit (o-o-o) von Aktinomycin C (5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Werden zu denselben Zeitpunkten auch die Hydroxyprolinwerte bestimmt, so kann man den Verlauf des relativen Anteils von Kollagen an Gesamtprotein bestimmen. Die dabei ermittelten Werte sind in Abb. 18 dargestellt. Chondrocyten synthetisieren in Suspensionskultur erheblich mehr Kollagen als Fibroblasten. Der Kollagenanteil bei Chondrocyten scheint allerdings mit der Inkubationszeit etwas abzufallen, während der Anteil bei Fibroblasten stabil bleibt oder sogar schwach ansteigt. Die Wirkung des Aktinomycins auf Chondrocyten in Monolayerkultur wird in Teil III geschildert.

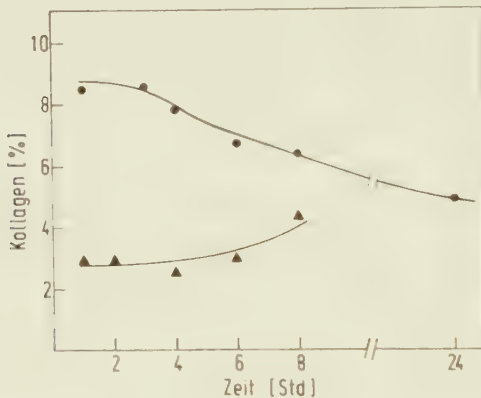


Abb. 18

Prozentualer Anteil der Kollagen- an der Gesamtproteinsynthese in Hühnerchondrocyten (●-●-●) und Fibroblasten (▲-▲-▲) in Suspensionskultur

### 1.2 Reaktion auf die Erhöhung der Kulturtemperatur

37°C ist die übliche Temperatur für die Kultivierung von Zellen in vitro, was nur suboptimale Bedingungen für Hühnerzellen sind, da deren physiologische Temperatur 39°C beträgt.

Mißt man den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin als Maß für die Synthese von DNA, so erhält man Hinweise auf die Zellteilungsaktivität. Wachsen Fibroblasten und Chondrocyten in Monolayerkultur, so zeigt Abb. 19, daß sich bereits bei  $37^\circ\text{C}$  Fibroblasten erheblich schneller teilen. Die Erhöhung der Temperatur auf  $39^\circ\text{C}$ , also physiologische Bedingungen, macht den Unterschied noch viel deutlicher.

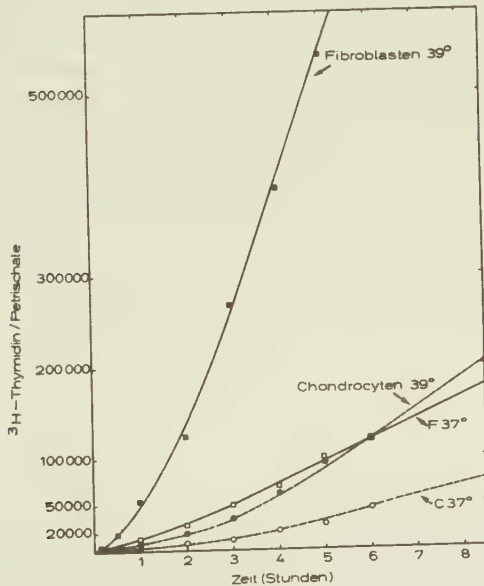


Abb. 19

$^3\text{H}$ -Thymidineinbau in Fibroblasten und Chondrocyten bei  $37^\circ\text{C}$  und  $39^\circ\text{C}$  in Monolayerkultur

### 1.3 Einfluß von Prokollagenpeptid (Col 1) von Typ I Kollagen auf die Kollagensynthese

Prokollagenpeptide entstehen bei der Umwandlung von Prokollagen zu Kollagen, während der Sekretion des Moleküls in den extrazellulären Raum (12).

Die Inhibitionswirkung des Prokollagenpeptiden des N terminalen Endes von Typ I Kollagen vom Kalb konnte bei der Synthese von Typ I Kollagen in Fibroblasten nachgewiesen werden (43). Wie Tabelle 2 zeigt, erstreckt sich diese Inhibitionswirkung jedoch nicht auf die Synthese von Typ II Kollagen von Kalbschondrocyten. In Anwesenheit von 4  $\mu$ Mol/ml synthetisieren Chondrocyten Kollagen und andere Proteine in unveränderter Menge weiter. Die Wirkung des Extensionspeptids des Typ I Kollagens ist also typspezifisch.

Tabelle 2

Hemmung der Kollagenbiosynthese durch das Prokollagenpeptid Col 1 (4  $\mu$ Mol/ml)

|                   | Zelldichte | Hemmung der<br>Kollagen-<br>synthese | Protein-<br>synthese |
|-------------------|------------|--------------------------------------|----------------------|
| Fibro-<br>blasten | konfluent  | 33 %                                 | 0 %                  |
| Chondro-<br>cyten | konfluent  | 0 %                                  | 0 %                  |

## 2. "Dedifferenzierte" Chondrocyten im Vergleich zu "ursprünglichen" Chondrocyten und Fibroblasten

### 2.1 Morphologische Beobachtungen

Werden frisch isolierte Zellen, Fibroblasten und Chondrocyten, in Petrischalen ausgesät, so haften Fibroblasten sehr viel rascher an der Oberfläche an und nehmen sehr schnell ihre charakteristische Form an: sie sind länglich gestreckt und weisen eindeutig "Pole" auf (Abb. 20a). Chondrocyten hingegen brauchen länger, bis sie sich an der Oberfläche festsetzen, gewinnen aber z.B. unter dem Einfluß von calvarien konditioniertem Medium (CKM) oder Hühnerserum innerhalb von 2 - 3 Tagen ebenfalls rasch fibroblastoides Aussehen, wobei anfänglich flache, polygonale Formen überwiegen (Abb. 20b). Wie im Abschnitt III gezeigt werden wird, wirken CKM und Hühnerserum beschleunigend auf die Umschaltung. Bleibt die Genexpression erhalten, -z.B. in dicht ausgesäten Monolayer- so erscheinen die Chondrocyten rund und von viel extrazellulärer Matrix umgeben (Abb. 20 c).

### 2.2 Wachstumsverhalten

Die Zellteilungsrate unter in vivo und in vitro Bedingungen stellt neben der Morphologie ein weiteres Charakteristikum für die Physiologie von Zellen dar. In Abhängigkeit von der Wechselwirkung der Zellen mit der extrazellulären Matrix, sowie in Reaktion auf exogene Faktoren (Serum, Proteasen, Wachstumsfaktoren) weisen Zellen Unterschiede im Durchlaufen eines Teilungszyklus auf. Da bei der Isolierung der Zellen aus einem Organ (Sehnen, Sternum) sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die Zelloberfläche abgebaut bzw. verändert wird, sind diese Zellen, die dann in Serum haltigem Medium kultiviert werden, prinzipiell in einem teilungsbereiten Zustand (44).

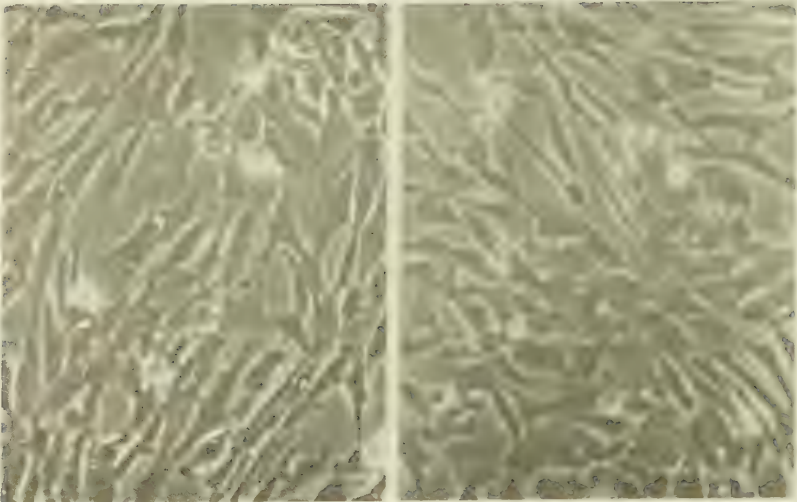
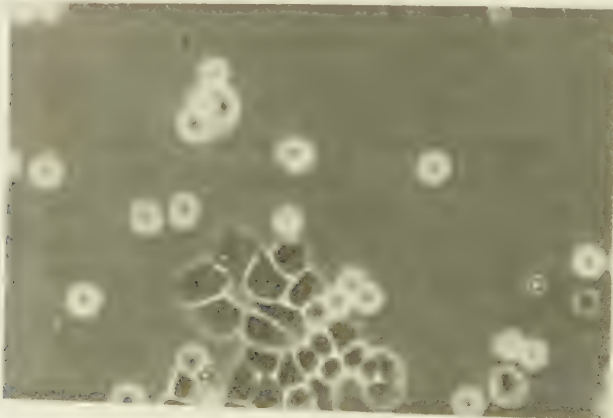


Abb. 20

Phasenkontrastaufnahme von

- a) Hühnerfibroblasten (2 Tage Kultur, Aussaat  $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ ) die typisch spindelförmige Gestalt zeigen.
- b) Hühnerchondrocyten (7 Tage Kultur mit Calvarien konditioniertem Medium (siehe Teil III), Aussaat  $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ ) die in ihrer Gestalt den Fibroblasten verwechselnd ähnlich sind.
- c) primären Hühnerchondrocyten. Nach 4 Tagen ML Kultur (Dichte  $10^5/\text{cm}^2$ ) haben sich noch nicht alle Zellen abgesetzt, bzw. gehen die Tochterzellen oft in Suspension.



Umso überraschender ist die Beobachtung, daß frisch isolierte Fibroblasten keine nennenswerte Teilung aufweisen, wenn man sie in Suspensionskultur hält. Erlaubt man den Fibroblasten dagegen, sich an Oberflächen abzusetzen, so werden dieselben Zellen zur Teilung stimuliert und in relativ kurzer Zeit einen Teilungszyklus durchlaufen (vergl. Abb. 21).

Dagegen können sich frisch isolierte Chondrocyten sowohl in Suspension wie in Monolayerkultur teilen, wenn auch sehr viel langsamer als Fibroblasten in Monolayerkultur. Im Laufe der Monolayerkultur, unter Bedingungen, die das Umschalten auf Typ I Kollagensynthese zulassen, nimmt auch die Teilungsrate der Chondrocyten zu.

In Abb. 21 ist nun ein Vergleich des Wachstumsverhaltens von Chondrocyten, die unter dem Einfluß von Hühnerserum auf Typ I Kollagensynthese umschalten, mit Fibroblasten und normalkultivierten Chondrocyten wiedergegeben. Zu diesem Zweck werden Zellen in einer geringen Dichte ( $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ ) in Petrischalen ausgesät und deren Wachstum durch Auszählen der Zellen über die folgenden 12 Tage verfolgt. Die Kurven in Abb. 21 machen deutlich, daß umgeschaltete Chondrocyten eine den Fibroblasten vergleichbare Teilungsrate besitzen.

Diese Beobachtung wird auch durch vergleichende Bestimmung des Einbaus von radioaktivem  $^3\text{H}$ -Thymidin in umgeschaltete Chondrocyten und Fibroblasten bestätigt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach Trypsinisieren in gleicher Dichte ( $10^5$ ) in kleine Petrischalen (3.5 cm Ø) ausgesät, nach einem Tag mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) markiert und dessen Einbau in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen findet man für beide Zelltypen eine beinahe identische Aufnahme von Thymidin, was auf eine ähnliche Syntheserate von DNA zurückzuführen ist (Abb. 22).

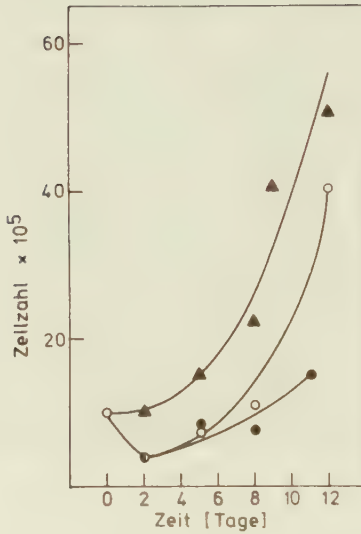


Abb. 21

Wachstumskurven von Hühnerchondrocyten, kultiviert mit FKS (●-●-●) und Hühnerserum (○-○-○) und Fibroblasten (▲-▲-▲) über 12 Tage ML Kultur. Die Zellen ( $10^6$  in Petrischalen mit 10 cm Ø) waren nicht konfluent ausgesät worden, um Teilungen zu ermöglichen.

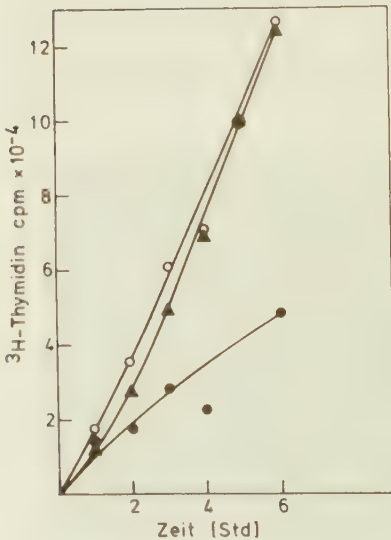


Abb. 22

<sup>3</sup>H-Thymidineinbaurate von Chondrocyten (●-●-●), dedifferenzierten Chondrocyten (○-○-○) und Fibroblasten (▲-▲-▲), die in gleicher Dichte ausgesät waren.

### 2.3 Einbau von radioaktivem Prolin und Synthese von Kollagen

Die Proteinsyntheseleistung stellt einen weiteren Parameter zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen dar. Dabei muß allerdings festgestellt werden, daß Zellen unterschiedlich "sensitiv" auf die in vitro Kulturbedingungen reagieren, und daß die modulierenden Faktoren noch kaum bekannt sind.

In unseren Untersuchungen wurden konfluente Monolayer von Fibroblasten, Chondrocyten und umgeschalteten Chondrocyten aus embryonalen Hühnchen zum gleichen Zeitpunkt mit radioaktivem Prolin inkubiert, der Typ Kollagen bestimmt (Chromatographie an CM-Cellulose), der Prolineinbau als Maß für Proteinsynthese und Hydroxyprolineinbau als Maß für Kollagensynthese ermittelt und die erhaltenen Werte auf die Zellzahl bezogen. Die Ergebnisse in Tabelle 3 sind aus drei unabhängigen Experimenten erhalten worden.

Tabelle 3

Kollagensyntheserate von Chondrocyten, Fibroblasten und "dedifferenzierten" Chondrocyten, die nach 1wöchiger ML Kultur in konfluentem Zustand radioaktiv markiert wurden.

|                     | Anteil<br>Typ I<br>% | Kollagensynthese-<br>rate<br>$\text{cpm} \times 10^6 / 10^6$ Zellen | Anteil Kollagen<br>an Gesamtprotein<br>% |
|---------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Chondro.            | 0                    | 0.3                                                                 | 10                                       |
| dediff.<br>Chondro. | 80                   | 0.1                                                                 | 1 - 2                                    |
| Fibro.              | 100                  | 0.1                                                                 | 1 - 2                                    |

Es fällt auf, daß Fibroblasten und umgeschaltete Chondrocyten sich in qualitativer und quantitativer Weise sehr ähnlich verhalten. Beide Zelltypen weisen einen ähnlichen Kollagenanteil auf, der mit 1 - 2 % des Gesamtproteins signifikant niedriger als der primärer Chondrocyten (10 %) liegt.

#### 2.4 "Resuspension" von Monolayerkulturen

Da, wie oben erwähnt, Fibroblasten und Chondrocyten auf die Kultivierung in Suspension unterschiedlich reagieren, wurden Monolayerkulturen von Typ II und Typ I Kollagen synthetisierenden Chondrocyten und Fibroblasten in Suspension untersucht. Die Zellen wurden nach 17tägigem Wachstum trypsinisiert und danach aufgeteilt, einerseits für die Suspensionskultur ("Resuspension"), andererseits für erneute Monolayerkultur, um einen Vergleich dieser drei Zelltypen in den beiden Kultursystemen herbeizuführen. Über den Einbau radioaktiv markierten Prolins wurde die allgemeine Protein- und Kollagensynthese während eines Pulses über 6 Stunden bestimmt.

Die Chondrocytenkulturen unterschieden sich darin, daß eine sich in der Anfangsphase des Umschaltens befand (Monolayerkultur mit 10 % FKS), während die andere (10 % Hühnerserum) bereits zwischen 60 - 70 % Typ I Kollagen synthetisierte. Abb. 23 zeigt Chromatogramme an CM-Cellulose unter denaturierenden Bedingungen, wobei Chondrocyten, umgeschaltete Chondrocyten und Fibroblasten jeweils in Monolayer wachsend mit der Suspensionskultur verglichen wurden.

Fibroblasten synthetisieren in Monolayer und in Suspensionskultur ausschließlich Typ I Kollagen (Abb. 23 C). Chondrocyten mit geringer Umschalt-"Quote" synthetisieren im Monolayer 20 % Typ I und 80 % Typ II Kollagen, nach Resuspension findet man nur noch Typ II Kollagen (A). Am Auffallendsten sind die Ergebnisse bei den Chondrocyten, die in Monolayer zwischen 60 und 70 % Typ I Kollagen synthetisieren, nach Resuspension jedoch keinen signifikanten Anteil an Typ I mehr erkennen lassen (B). Die obigen Prozentangaben sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Prozentaler Anteil des Typ II Kollagens

|            | Chondro. | dediff. Chondro. | Fibro. |
|------------|----------|------------------|--------|
| Monolayer  | 80 %     | 30 %             | 0 %    |
| Suspension | 100 %    | 100 %            | 0 %    |

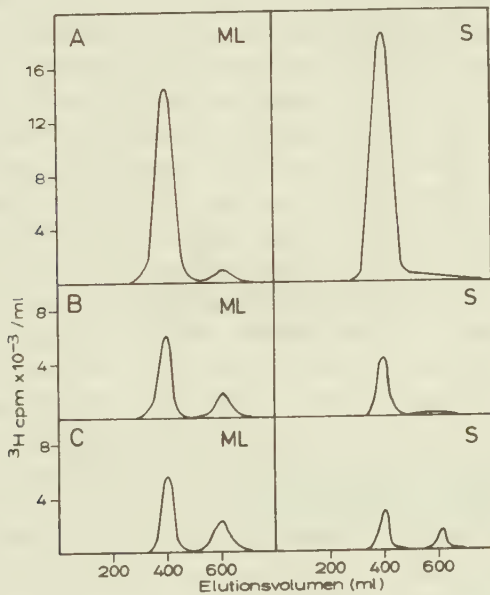


Abb. 23

CMC Chromatogramme des Kollagen, das Hühnerchondrocyten (A), dedifferenzierte Chondrocyten (B) und Fibroblasten (C) in Monolayer (ML) und Suspension (S) während eines 6 Stunden-Pulses mit  $^3\text{H}$ -Prolin synthetisieren. Die Zellen waren über 17 Tage als ML gewachsen und nach Trypsinisieren in ML bzw. Suspension radioaktiv markiert worden. Unter dem Einfluß von Hühnerserum im Gegensatz zu FKS schalten die Chondrocyten sehr viel schneller auf die Synthese von Typ I Kollagen um.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt wird deutlich, wenn man die Menge des in Monolayer und Suspension synthetisierten Kollagens in Betracht zieht, wie es in Abb. 24 geschehen ist, wobei die in pepsinstabiles Protein eingebaute Radioaktivitätsmenge auf  $10^6$  Zellen bezogen wurde.

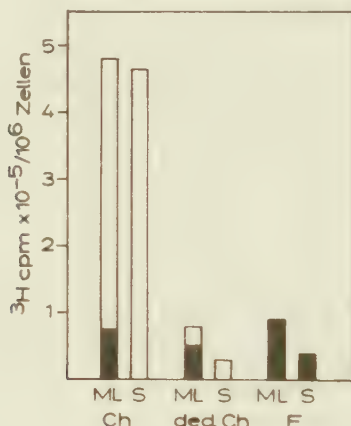


Abb. 24

Säulendiagramm der Kollagenmenge, die Hühnerchondrocyten, "dedifferenzierte" Hühnerchondrocyten und Fibroblasten in ML und Suspension (S) während eines 6 Stunden-Pulses mit  $^3\text{H}$ -Prolin synthetisieren (ausgefüllte Säulen Typ I Kollagen, offene Säulen Typ II Kollagen).

Danach synthetisieren Fibroblasten in Monolayer wie in Suspensionskultur nur etwa 1/5 bis 1/6 dessen, was Chondrocyten unter denselben Kulturbedingungen leisten. Außerdem fällt der Synthesewert der Fibroblasten in Suspension auf die Hälfte dessen in Monolayer, während die noch weitgehend differenzierten Chondrocyten bei dem Übergehen in die Resuspension ihren Synthesewert leicht erhöhen oder zumindest halten. Chondrocyten, die nach Tabelle 3 60 - 70 % Typ I Kollagen in Monolayer synthetisieren, fallen bei

Resuspension auf 1/3 ihres ML-Synthesewertes ab und verhalten sich damit ähnlich wie Fibroblasten. Die Reduktion in der Kollagensynthese entspricht ungefähr dem mengenmäßigen Anteil des Typ I Kollagen, dessen Synthese in Suspension ganz eingestellt ist.

## 2.5 Beziehung von Synthese zu Degradation

Die meisten Untersuchungen zum Metabolismus des Kollagen konzentrieren sich einerseits auf die Bestimmung von Typ und Quantität des Kollagens oder andererseits auf Reinigung und Charakterisierung von Collagenasen. In welchem Umfang unter in vitro Bedingungen der Gewebekultur neu synthetisiertes Kollagen dem Abbau unterworfen ist, ist noch gänzlich unbekannt. Da Hydroxyprolin eine Aminosäure darstellt, die fast ausschließlich in Kollagen vorkommt und auch nur auftritt, wenn sie in einer Peptidkette eingebaut war und nach Abbau nicht wiederverwendet werden kann, kann die Menge an Hydroxyprolin, die dialysabel ist, als ein Maß für den Abbau von Kollagen angesehen werden. Der allgemeine Proteinkatabolismus kann allerdings nicht in entsprechender Weise bestimmt werden, da dafür keine "einmalige" Aminosäure zur Verfügung steht.

Die Menge an Kollagen (nichtdialysables Hyp) und an abgebautem Kollagen (dialysables Hyp) wurde für Fibroblasten, Chondrocyten und "dedifferenzierte" Chondrocyten bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen für einen 24stündigen Puls mit  $^3\text{H}$ -Prolin in Monolayerkultur sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Degradation des Kollagen

|          | % Typ I | % Kollagen | Anteil degradierten Kollagens von Gesamtsynthetisiertem |
|----------|---------|------------|---------------------------------------------------------|
| Chondro. | 0       | 8          | 48.5 %                                                  |
| dediff.  | 66      | 2          | 32.4 %                                                  |
| Chondro. |         |            |                                                         |
| Fibro.   | 100     | 2          | 20.0 %                                                  |

Die erste bzw. zweite Spalte geben nochmals Werte für den Anteil an Typ I Kollagen bzw. den Anteil von Kollagen an Gesamtprotein wieder. Die dritte Spalte läßt deutlich erkennen, daß der Anteil des abgebauten und dialysablen Kollagens kontinuierlich von Chondrocyten über "dedifferenzierte" Chondrocyten zu Fibroblasten hin abnimmt. "Dedifferenzierte" Chondrocyten liegen mit einem Wert von 32.4 % fast in der Mitte der Skala. Als Maß für die Degradation bedeuten diese Werte, daß bei ursprünglichen Chondrocyten nach 24 h Inkubationszeit rund die Hälfte des synthetisierten Kollagens wieder degradiert ist. In "dedifferenzierten" Chondrocyten und Fibroblasten ist der Abbau geringer. Ein Grund dafür könnte die höhere Unlöslichkeit des synthetisierten Typ I Kollagens liefern, d.h. die Bildung stabilerer und größerer Fibrillen. Ergänzend zeigen nämlich diese Untersuchungen, daß Fibroblasten und dedifferenzierte Chondrocyten einen wesentlich höheren Anteil an unlöslichem Kollagen aufweisen als authentische Chondrocyten; dieses Kollagen wird wohl nur schwerer in den Degradationsprozeß einbezogen.

## 2.6 Bindung von Concanavalin A - Ausdruck von Rezeptoreigenschaften der Zelloberflächen

Während der "Dedifferenzierung" der Chondrocyten in vitro verlieren die Zellen ihre extrazelluläre Matrix, die Zelloberfläche wird größer und sie teilen sich schneller. Diese Veränderungen sollten sich besonders in modifizierten Membraneigenschaften widerspiegeln. Pflanzenlektine, unter ihnen besonders das Concanavalin A, haben eine hohe Bindungsspezifität zu Glycoproteinen, die an der Zellmembran für eine Anzahl membranvermittelter Erscheinungen verantwortlich sind, wie z.B. Hormoneinflüsse, Erkennen von Antikörpern, Zellanhaftung und Kontaktinhibition (45). Mögliche Unterschiede der Zelloberfläche zwischen Chondrocyten und dedifferenzierten Chondrocyten aufzuspüren, galten die folgenden Bindungsversuche mit Concanavalin A.

Chondrocyten, "dedifferenzierte" Chondrocyten und Fibroblasten wurden in Mikrottestplatten in gleicher Dichte ( $4 \times 10^4$ ) ausgesät und nach 3 Tagen mit  $^3\text{H}$ -acetyliertem Con A inkubiert (siehe Material und Methoden). Der Anteil an unspezifischer Bindung wurde durch eine Präinkubation mit kaltem Con A (2 mg/ml) ermittelt. Außerdem wurde in Kontrollexperimenten nachgewiesen, daß die Adsorption von der Zellzahl abhängig ist. Abb. 25 zeigt die Adsorption von Con A an Zellen in Abhängigkeit von der angebotenen Menge Con A.

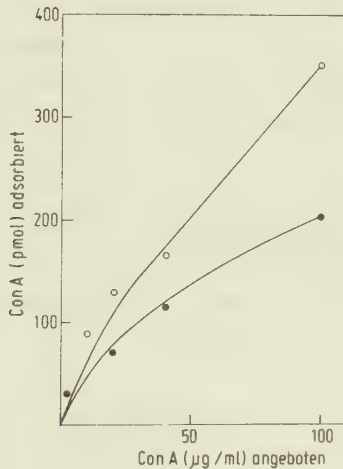


Abb. 25

Adsorption von Con A an Chondrocyten (●-●-●) und "dedifferenzierten" Chondrocyten (○-○-○) in ML Kultur in Abhängigkeit von der angebotenen Con A Menge.

In diesem Konzentrationsbereich scheinen "dedifferenzierte" Chondrocyten eine höhere Kapazität für die Bindung von Con A zu besitzen als ursprüngliche Chondrocyten. Verfolgt man in einem ähnlichen Versuch die Bindungskapazität über einen

größeren Konzentrationsbereich und im Vergleich zu Fibroblasten, so bilden Chondrocyten und "dedifferenzierte" Chondrocyten eine Zellgruppe mit vergleichbarer Affinität zu Con A (Abb. 26). Sie unterscheiden sich darin von jungen und in vitro gealterten Fibroblasten, die beide beträchtlich weniger Con A zu binden vermögen.

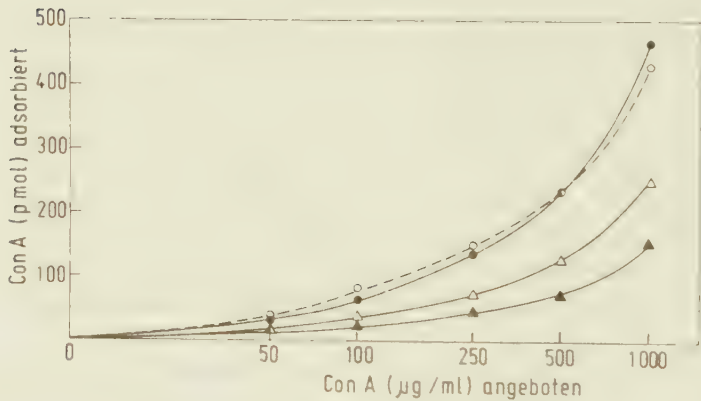


Abb. 26

Adsorption von Con A an Chondrocyten (●-●-●), "dedifferenzierte" Chondrocyten (o-o-o), primäre (▲-▲-▲) und in ML gealterte Fibroblasten (△-△-△) in Abhängigkeit von der angebotenen Con A Menge.

Zusammenfassung der Ergebnisse in Teil II

1. Neben der Kollagentypensynthese, der extrazellulären Matrix und Morphologie unterscheiden sich Chondrocyten von Fibroblasten in ihrer geringeren Teilungsrate in vitro, ihrem Verhalten in Suspension und der Regulation der Kollagenbiosynthese durch das Col 1 Peptid.
2. Dedifferenzierte Chondrocyten gleichen in wesentlichen physiologischen Parametern Fibroblasten:  
Morphologie, Wachstum, Typ I Kollagensynthese, geringer prozentualer Anteil der Kollagen- an der Gesamtprotein-synthese, geringe Syntheserate in Suspension, gesenkter Kollagenabbau.

In ihrer Oberflächenstruktur bezüglich des Con A unterscheiden sie sich sowohl von primären Chondrocyten wie auch von Fibroblasten.

### III. Untersuchungen zur Beschleunigung der "Dedifferenzierung"

Ein Zellsystem, das unter experimentellen Bedingungen eine Reihe von Änderungen seiner morphologischen und biochemischen Eigenschaften durchläuft, scheint geeignet, Fragen der Stabilität eines differenzierten Zustandes und dessen Abhängigkeit von exogenen Faktoren beantworten zu können. Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, kann ein solcher Prozeß der internen Reorganisation in Chondrocyten in vitro erkannt werden, da deren zellspezifische Synthese von Typ II Kollagen graduell der Synthese von Typ I Kollagen weicht.

Erste Voraussetzung zur Untersuchung der Regulation der Genexpression auf dem zellulären Niveau ist die Beeinflussbarkeit des gewählten Systems, hier die Beschleunigung oder das Aufhalten des Umschaltens. Da das Umschalten der Kollagensynthese unter in vitro Bedingungen möglich ist, schien die Beschleunigung des Prozesses aufschlußreicher zu sein als die Stabilisierung des differenzierten Zustands. Es sollte daher versucht werden, das in vitro beobachtete Umschalten einer Chondrocytenkultur in ihrer Kollagensynthese innerhalb von 4 Wochen so zu beschleunigen, daß Veränderungen gut und zuverlässig in eine zeitliche Korrelation gebracht werden könnten.

In dieser Hinsicht ist ein in vitro System von Chondrocyten noch als wenig ideal anzusehen, da das Umschalten von Typ II auf Typ I Kollagen als biochemischer Markerprozeß sich in der Massenkultur über einige Wochen erstreckt und daher als Testsystem nicht geeignet ist. Deshalb galten die Untersuchungen des Teil III vornehmlich dem Problem, durch Manipulation der exogenen Kulturverhältnisse zu einem beschleunigten Umschalten zu kommen. Dies wiederum würde dem Verstehen der Regulation der Proteinbiosynthese in Eukaryonten einen experimentellen Zugang liefern.

## 1. Zusatz von Aktinomycin C als Transkriptionshemmer

Mit den im folgenden beschriebenen Versuchen sollte geklärt werden, ob man Chondrocyten rasch an m-RNA für Typ II Kollagen verarmen kann, indem man durch Zugabe von Aktinomycin C zum Kulturmedium die Transkription inhibiert (42). Dazu war es notwendig, wenigstens grobe Hinweise auf die Halbwertszeit der m-RNA von Typ II Kollagen zu erhalten, und zugleich zu testen, ob Aktinomycin aus der Zelle ausgewaschen werden kann. Unter diesen Voraussetzungen erschien es denkbar, daß die mit Aktinomycin behandelten Chondrocyten an m-RNA für Proteine des differenzierten Zustands verarmen und nach Entfernen des Transkriptionshemmers nur noch Typ I Kollagen synthetisieren.

### a) Einfluß von Aktinomycin auf die RNA-Synthese

Frisch isolierte Chondrocyten ( $10^5$  Zellen / ml) wurden in Suspensionskultur gehalten und mit  $^3\text{H}$ -Uridin ( $5 \mu\text{Ci/ml}$ ) markiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden aliquote Anteile aus der Zellsuspension entnommen und deren Radioaktivitätsmenge, die mit TCA fällbar war, ermittelt (Abb. 27, durchgezogene Linie). Nach 4,5 und 6 Stunden wurden ebenfalls Proben entnommen, mit Aktinomycin C versetzt ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) und deren weiterer Verlauf der Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Uridin verfolgt (Abb. 27, gestrichelte Linie).

Wie Abb. 27 zeigt, bauen Chondrocyten  $^3\text{H}$ -Uridin im Versuchszeitraum über 6 Stunden linear ein. Nach Zugabe von Aktinomycin wird der weitere Einbau gestoppt, und darüberhinaus innerhalb der nächsten Stunde ein rascher Abbau der markierten RNA beobachtet. Der weitere Abbau erfolgt erheblich langsamer, strebt aber in jedem Fall einem Wert von verbleibender, radioaktiv markierter RNA zu, der bei 40 % der ursprünglich markierten liegt.

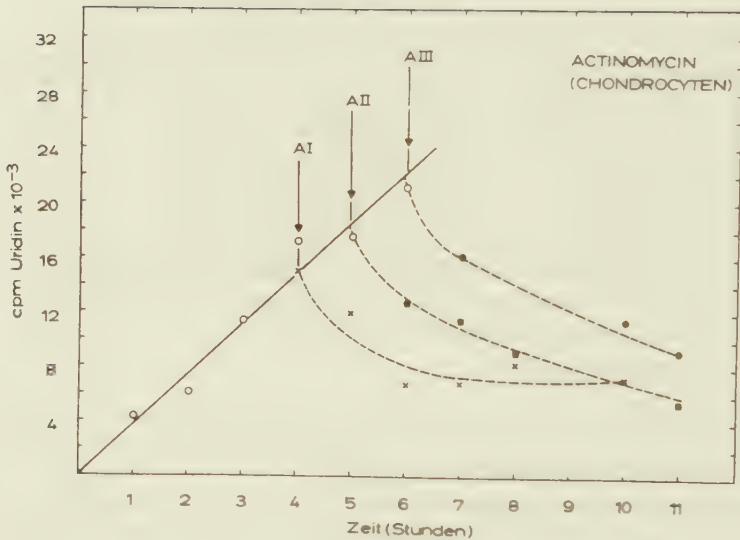


Abb. 27

Abbau der radioaktiv markierten RNA unter dem Einfluß von Aktinomycin C. ——— Einbau von  $^3\text{H}$ -Uridin, ----- Abnahme der radioaktiv markierten RNA nach Zugabe von Aktinomycin C.

Wie der folgende Versuch zeigt, ist die rasche Abnahme von RNA auch von einer parallelen Abnahme der Protein- und Kollagensynthese begleitet. Dazu wurden frisch isolierte Chondrocyten in Suspensionskultur mit  $^3\text{H}$ -Uridin ( $5 \mu\text{Ci/ml}$ ) inkubiert. Nach 18 h Inkubationszeit, wenn der Einbau in RNA gesättigt ist, wurde der weitere Einbau durch Aktinomycin blockiert. Wie das Versuchsschema in Abb. 28 zeigt, wurde danach die Zellsuspension in aliquote Anteile aufgespalten und diese zum Zeitpunkt 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit  $^3\text{H}$ -Prolin versetzt, um die allgemeine Proteinsynthese (Pro) und die Kollagensynthese (Hyp) über weitere 24 h zu verfolgen (Abb. 29). Zu den gleichen Zeitpunkten wurde auch die mit TCA fällbare RNA-Menge bestimmt (Abb. 28 u. 29).

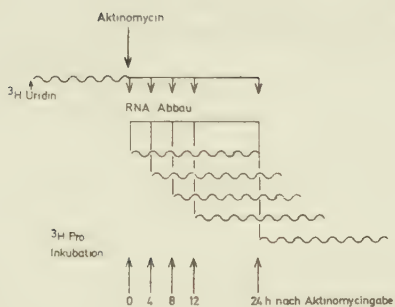


Abb. 28

Versuchsschema zur Untersuchung des Abbaus der radioaktiv markierten RNA nach Aktinomycin C Gabe und des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Prolin nach Inhibition der Transkription durch Aktinomycin C ~ radioaktive Inkubationsphase.

Abb. 29 zeigt deutlich, daß der Abbau von radioaktiv-markierten RNA rasch erfolgt und nach 5 h nur noch 50 % der ursprünglich markierten Menge nachgewiesen werden kann. Parallel dazu findet man auch eine Abnahme der Protein- wie Kollagensynthese (50 % nach 5 h). Fibroblasten zeigen unter vergleichbaren Bedingungen eine ähnliche Korrelation von RNA-Abbau und Abnahme der Proteinsynthese. Diese Versuche können zur Bestimmung der Halbwertszeit herangezogen werden, wobei in erster Annäherung ein Wert von 4 - 6 Stunden für die Halbwertszeit der m - RNA für Kollagen aus der Kurve erhalten wird.

#### b) Einfluß des Aktinomycin auf die Kollagensynthese

Unter der Annahme der Verarmung der m-RNA für Typ II Kollagen nach Hemmung mit Aktinomycin C, sollte einerseits festgestellt werden, ob die Kollagensynthese danach ohne Aktinomycin wieder einsetzt und ob andererseits ein anderer Kollagentyp synthetisiert wird.

Die Frage nach der Beeinflußbarkeit der Genexpression von Chondrocyten nach Behandlung mit Aktinomycin C, sollte in folgendem Versuch beantwortet werden.

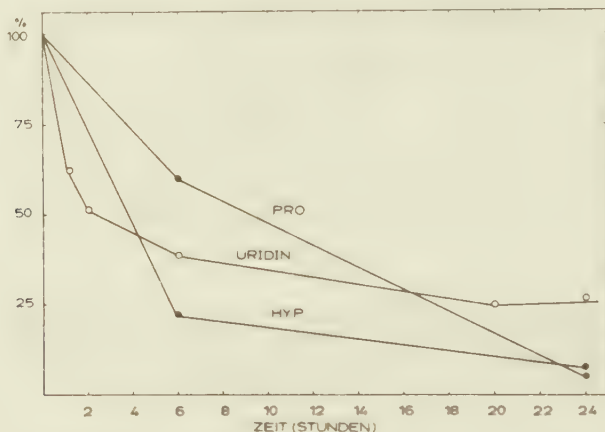


Abb. 29

Prozentuale Abnahme des eingebauten  $^3\text{H}$ -Uridin (o-o-o, siehe Schema Abb. 28) und der Protein(Pro)- und Kollagen(Hyp) synthese-rate nach Zugabe von Aktinomycin C zu einer Hühnerchondrocytensuspension zur Zeit 0. Nach verschieden langen Präinkubationszeiten (Abszisse) mit Aktinomycin werden die Zellen für 24 h mit  $^3\text{H}$ -Prolin radioaktiv markiert. Die Werte der Hyp- und Pro-Kurve stellen die Radioaktivitätsmenge in Protein und Kollagen dar, die prozentual zur Kontrolle noch übrigbleiben.

Frisch isolierte Chondrocyten wurden als Monolayer ( $5 \times 10^6$  Zellen / Petrischale) ausgesät und 24 h unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank gehalten. Probe 1 und 2 (nach Abb. 30) erhielten danach für einen weiteren Tag Aktinomycin C ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt, während die Petrischalen der Gruppe 3 ohne das Antibiotikum blieben. Zum nächsten Zeitpunkt wurden alle Proben mit radioaktiv markiertem Prolin inkubiert, wobei Probe 1 weiterhin Aktinomycin C enthielt, während das Medium von Probe 2 und 3 frei davon war. Probe 2 wurde 3 x mit PBS gewaschen.

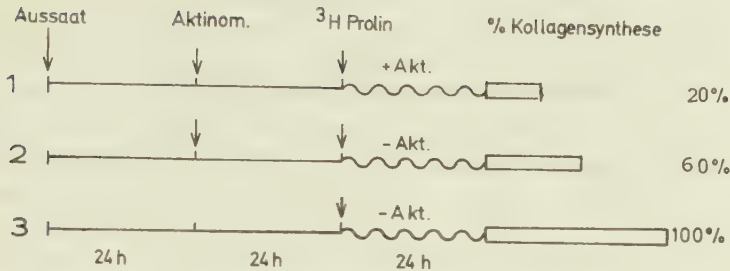


Abb. 30

Versuchsschema zur Untersuchung des Einflusses des Aktinomycin C auf die Kollagensynthese von Hühnerchondrocyten und die Hemmung der Kollagensynthese bezogen auf die Kontrolle (3).  
~~~~~ radioaktive Inkubationsphase.

Wie Abb. 30 zeigt, produzieren Chondrocyten, die mit Aktinomycin C vorbehandelt waren, aber während der Inkubation mit ³H-Prolin kein Antibiotikum enthielten (2), nur geringfügig mehr Kollagen als Chondrocyten, die auch während der Inkubation noch Aktinomycin C enthielten (1). Dieser Befund weist darauf hin, daß Aktinomycin C trotz intensiven Waschens nicht aus den Zellen entfernt werden kann. Außerdem zeigt Abb. 31 deutlich, daß Chondrocyten auch noch Behandlung mit Aktinomycin C weiterhin Typ II Kollagen synthetisieren, da bei der Chromatographie an CM-Cellulose unter denaturierenden Bedingungen keine α_2 Ketten beobachtet werden. Die Kollagensynthese von Chondrocyten ist also durch Aktinomycin irreversibel und nur quantitativ beeinflussbar.

2. Umschalten der Kollagenbiosynthese unter Kulturbedingungen, die Proliferation und intrazelluläre Degradation beeinflussen

Eine Teilaufgabe dieser Arbeit war es, durch Einflußnehmen auf das Umschalten der Chondrocyten in Kultur mit exogenen Faktoren Hinweise auf Mechanismen und Wege der Dedifferenzierung und auf Zusammenhänge mit anderen Stoffwechselwegen wie Zellwachstum und Proteinsynthese zu bekommen.

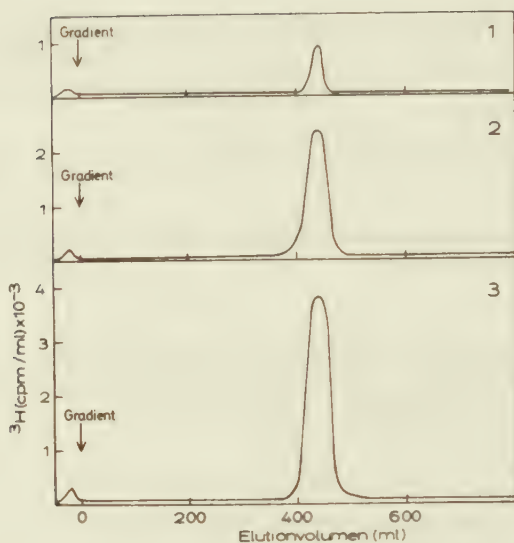


Abb. 31

CMC Chromatogramme des Kollagens, das Hühnerchondrocyten in ML synthetisieren. Die Zellen wurden, wie Abb. 30 zeigt, mit Aktinomycin behandelt. Das unter diesen verschiedenen Bedingungen synthetisierte Typ II Kollagen unterscheidet sich nur in seiner Menge.

Da es grundsätzlich bei der in vitro Kultur von Chondrocyten in Monolayer zum Umschalten auf Typ I Kollagensynthese kommt, jedoch erst nach circa 4 Wochen, wurde versucht, die Induktion der Typ I Kollagensynthese zu beschleunigen. Als System erwies sich die 1wöchige Monolayerkultur von Hühnerchondrocyten als günstig, die unter normalen Bedingungen noch keine Typ I Kollagensynthese zulässt, während verschiedene Faktoren in diesem Zeitraum schon ein vollständiges Umschalten ermöglichen.

Für diese Untersuchungen wurden frisch isolierte Chondrocyten in Petrischalen in relativ geringer Dichte (10^6 Zellen/Petrischale, 10 cm Ø) ausgesät, und nach 24 Stunden, nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, mit Medium, welches

mit entsprechenden Zusätzen versetzt war, weiterkultiviert, oder es wurden die Kulturbedingungen (z.B. Temperatur) verändert. Nach 8 Tagen wurde die Morphologie im Lichtmikroskop beurteilt sowie der Einbau von radioaktiv markiertem Prolin durch die Zellen und die Proliferationsrate bestimmt. Am Auftreten der α_2 -Ketten bei der Chromatographie an CM-Cellulose wurde der Einfluß auf die Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagen abgeschätzt. Als Kontrollen dienten Zellen, die in Hams F-10 Medium mit 10 % FKS unter 5 % $\text{CO}_2/95$ % Luft - Begasung bei 37° kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen war bei den Kontrollen nach 8 Tagen noch kein Umschalten auf Typ I Kollagen Synthese zu beobachten, sondern erst nach 4 Wochen.

Da die Möglichkeit zur Zellteilung und der Verlust der extrazellulären Matrix sich, wie in Teil I dargestellt, als notwendig für die Änderung der Genexpression erwies, wurden verschiedene Kulturbedingungen gewählt, die beides begünstigen.

Im Einzelnen wurden zur Beeinflussung der Zellteilung folgende Bedingungen gewählt:

Foetales Kälberserum wurde in 30 % Konzentration verwendet (Normalbedingungen: 10 %). Der mitogene Einfluß von Serum ist besonders gut bei kontaktinhibierten Fibroblastenkulturen untersucht worden, wo man eine Verkürzung des Zellzyklus beobachtet hatte (46). Nochmalige, vorsichtige Behandlung der Zellen mit Trypsin (0.25 %) verändert die Zelloberfläche und ihre Rezeptoren und initiiert damit ebenfalls die Zellteilung (47 - 49). Zyklische Nukleotide können einerseits die Zellteilung von Fibroblasten beschleunigen (cGMP 10^{-4}M), andererseits dämpfen (cAMP 10^{-4}M). In Verbindung mit dem Phosphodiesterase-Hemmer, Theophyllin (10^{-4}M), verändert cAMP die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Nukleotids (50 - 52). Die Kultivation bei 39°C der Körpertemperatur der Hühner, wurde gewählt, um die physiologischen Bedingungen

für Hühnerzellen zu optimieren. Zugabe von Hydroxyharnstoff ($10^{-4}M$), das auf die Ribonukleotid Reduktase hemmend wirkt und damit die DNA Synthese inhibiert, sollte die Zellteilungsrate senken (53). Eine ähnliche Wirkung wurde erzielt, wenn Chondrocyten bei niedерem pH (6.3) kultiviert wurden (54).

Die Stabilität der extrazellulären Matrix und der gesamte Proteinstoffwechsel sollte durch folgende Bedingungen beeinflusst werden:

Durch Anheben des pH (8.1) sollte eine Hemmung der Degradation und eine Stabilisierung der sauren Mucopolysaccharide erreicht werden. Vitamin A (Retinolsäure 3 - 30 $\mu g/ml$) wurde zugesetzt, um über eine Destabilisierung der lysosomalen Membranen eine Ausschüttung degradierender Enzyme, z.B. Nukleasen und Proteasen, zu erzielen (55, 56, 57). Entsprechend Untersuchungen anderer Laboratorien (Holtzer, Dorfman, Mayne) wurde das Thymidinanalogon BUDR ($10^{-4}M$) dem Kulturmedium zugesetzt, um die erzielten Effekte mit den schon bekannten zu vergleichen (58 - 61). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Aus der Morphologie ergaben sich meist schon Hinweise auf ein biochemisches Umschalten der Kollagensynthese. Niemals wurden runde Chondrocyten beobachtet, die Typ I Kollagen synthetisieren, andererseits zeigten alle fibroblastoiden Zellen einen hohen Anteil an Typ I Kollagen. Mit der Immunfluoreszenztechnik wurde ersichtlich, daß Zellen mit polygonaler Gestalt zur Synthese beider Typen befähigt sind (62). Die meisten Versuchsbedingungen, die eine Proliferation der Zellen zulassen, scheinen anzudeuten, daß eine vermehrte Teilungsrate ein Umschalten der Kollagensynthese nachsichzieht.

Da jedoch demgegenüber unter dem Einfluß von Hydroxyharnstoff und bei Zugabe von Vitamin A sich die Zellen kaum teilen, die Kollagensynthese dennoch umgeschaltet ist, kann die Reorganisation der Genexpression nicht notwendigerweise an eine Zellteilung gebunden sein.

Tabelle 6

Einfluß wachstums- und stoffwechselaktiver Faktoren und Kulturbedingungen auf die Proteinsynthese und das Umschalten von Hühnerchondrocyten in Monolayerkultur (Zell-dichte $10^6/10 \text{ cm } \varnothing$ Petrischale). Kontrollen zeigen nach 8 Tagen ML Kultur keine Typ I Kollagensynthese.

- + mehr als Kontrolle
- O gleich wie Kontrolle
- weniger als Kontrolle

| | Morphologie | Prolife-
ration | Prolinein-
bau/Zelle | Umschalten |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------|------------|
| Kontrolle | polygonal | O | O | O |
| 30 % FKS | polygonal | ++ | +++ | O |
| 39°C | rund | + | ++ | O |
| Trypsin | polygonal | + | ++ | + |
| cGMP | polygonal | O | ++ | O |
| cAMP | polygonal | - | - | - |
| nied. pH | fibroblastoid | - | - | n.b. |
| hoher pH | rund | ++ | O | n.b. |
| Hydroxy-
harnstoff | polygonal,
groß, flach | - | O | ++ |
| Vitamin A | polygonal | - | - | ++ |
| BUDR | fibroblastoid | O | O | ++ |

Offen bleiben muß auch die Frage, ob das Umschalten von Chondrocyten auf Typ I Kollagensynthese in erster Phase an eine Steigerung des Prolineinbaus gebunden ist. So findet man bei cAMP bzw. Vitamin A Zugabe nur niedrige Einbauraten von radioaktivem Prolin. Bei cAMP ist aber die Genexpression für Typ II Kollagen stabil, während man unter dem Einfluß von Vitamin A ein Umschalten von Typ II auf Typ I Kollagen beobachtet.

3. Kollagenbiosynthese von Chondrocyten unter dem Einfluß konditionierter Medien

Unter der Annahme, daß Zellen und Organe *in vitro* und *in vivo* Faktoren herstellen, die der Modulation der zellspezifischen und gewebespezifischen Genexpression dienen, wurden konditionierte Medien in ihrem Einfluß auf Chondrocyten *in vitro* untersucht. So sollte sich dabei zeigen, ob Typ I Kollagen synthetisierende Organe oder Zellen in das Medium Faktoren abgeben, die in Chondrocyten die Synthese von Typ II Kollagen blockieren und die von Typ I beschleunigt induzieren. Als ein im wesentlichen Typ I Kollagen synthetisierendes System wurden Schädelknochen (Calvarien) embryonaler Hühnchen und Fibroblasten verwendet, die aus Hühnersehnen isoliert wurden.

Als Vergleich dazu sollten Typ II Kollagen synthetisierende Sterna und Hühnerchondrocyten in konfluentem Monolayer dienen. Da die das Sternum als Perichondrium umgebenden Fibroblasten Typ I Kollagen synthetisieren, wurden sie in einer Vorbehandlung abgebaut, um sicher zu sein, daß diese Zellen nicht für die Induktion der Typ I Kollagensynthese in Chondrocyten verantwortlich sind (63 - 65).

Insgesamt wurden 24 Stunden Medien gesammelt von Kulturen intakter Calvarien (CKM) und Sterna (SKM), sowie von Fibroblasten (FKM) und Chondrocyten (ChKM) in dichtem Monolayer (siehe Material und Methoden), und frisch ausgesäten Chondrocyten angeboten. Die Medien enthielten 10 % foetales Kälberserum. Eventueller Verarmung an Wachstumsfaktoren wurde durch Mischen der konditionierten Medien mit frischem Hams F-10 Medium im Verhältnis 1:1 vorgebeugt. Ähnlich wie im vorherigen Abschnitt wurden die Chondrocyten hinsichtlich des Anhaftens an den Petrischalen, ihrer morphologischen Veränderungen, der Proliferationsrate, des Einbaus von ³H-Prolin und der Kollagensynthese untersucht und mit Kontrollen verglichen, die in Hams F-10 Medium (10 % FKS) ausgesät

(Dichte $3 \times 10^3/\text{cm}^2$) und kultiviert waren. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen 8 - 10 Tage in Petrischalen in den entsprechenden konditionierten Medien gewachsen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7

Einfluß konditionierter Medien und des Hühnerserums auf den Stoffwechsel und das Umschalten von Hühnerchondrocyten in Monolayer und Suspensionskultur. 10^6 Zellen wurden in Petrischalen (10 cm Ø) ausgesät oder in Suspension geschüttelt in Gegenwart verschiedener Medien über 8 Tage.

| | Morphologie | Anhaften | Wachstum | Protein-
synthese | Kollagen-
synthese | Umschalten |
|-------------------------------------|---------------|----------|----------|----------------------|-----------------------|------------|
| Kontrolle | polygonal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Calvarien konditioniertes Medium | | | | | | |
| in Monolayer | fibroblastoid | ++ | +(-) | - | - | +++ |
| in Suspension | rund | - | - | n.b. | - | ++ |
| Sterna konditioniertes Medium | | | | | | |
| + Perichondrium | polygonal | + | 0 | 0 | - | + |
| - Perichondrium | polygonal | + | 0 | n.b. | - | + |
| Fibroblasten konditioniertes Medium | fibroblastoid | + | ++ | - | - | ++ |
| Chondrocyten konditioniertes Medium | polygonal | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hühnerserum | fibroblastoid | + | ++ | - | - | ++ |

Die Wirkung des von Calvarien konditionierten Mediums (CKM) auf die Morphologie von Hühnerchondrocyten war schon nach 3 Tagen sichtbar. Nach 8 Tagen Monolayerkultur besteht das von beschleunigt umgeschalteten Chondrocyten synthetisierte Kollagen schon fast zu 80 % aus Typ I. Selbst in Suspensionskultur, in der normalerweise der differenzierte Zustand der Chondrocyten aufgrund organähnlicher Verhältnisse durch Zellaggregation sehr stabil ist und der für Fibroblasten ungünstig ist, konnte eine Typ I Kollagensynthese induziert werden.

Einen ähnlich starken Umschalteffekt hatte das Medium des anderen Typ I Kollagen synthetisierenden Systems, die Fibroblasten in ML, und das Hühnerserum.

Das als zweite Kontrolle gedachte System der Typ II Kollagen synthetisierenden Chondrocyten in Monolayerkultur zeigte keinen Umschalteffekt. Erstaunlicherweise induzierte aber das von Sterna konditionierte Medium, unabhängig von der Gegenwart des Perichondriums, die Typ I Kollagensynthese in geringem Maße.

Nach Tabelle 7 haben alle Medien mit Ausnahme des Mediums von dicht ausgesäten Chondrocyten in Monolayer einen beschleunigenden Einfluß auf die Umschaltung der Kollagensynthese von Typ II auf Typ I. Diesen Medien war auch gemeinsam, daß sie das Wachstum beschleunigten, während die morphologische Ausprägung der kultivierten Zellen trotz beschleunigter Umschaltung von Fibroblasten ähnlich (Abb. 33 a) bis polygonal (Abb. 33 b) variierte. In allen Fällen war die Synthese von Kollagen und der Einbau von Prolin niedriger als in Vergleichskulturen.

Ein quantitativer Vergleich des Grades der Umschaltung von normal kultivierten Chondrocyten mit solchen, die mit CKM kultiviert wurden, zeigt, daß die umgeschalteten bereits nach 10 Tagen soviel Typ I Kollagen synthetisieren wie die Vergleichskulturen erst nach 30 Tagen. Danach ist die Umschaltung um den Faktor 3 beschleunigt.

Zur ersten Charakterisierung der aktiven Komponente wurden konditionierte Medien dialysiert gegen frisches Medium, sowie einer Fraktionierung durch Membranfilter unterworfen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Es wurde in allen Fällen deutlich, daß der aktive Faktor nicht dialysabel ist, wobei die Membranfiltration ein Molekulargewicht von größer 300 000 Dalton wahrscheinlich

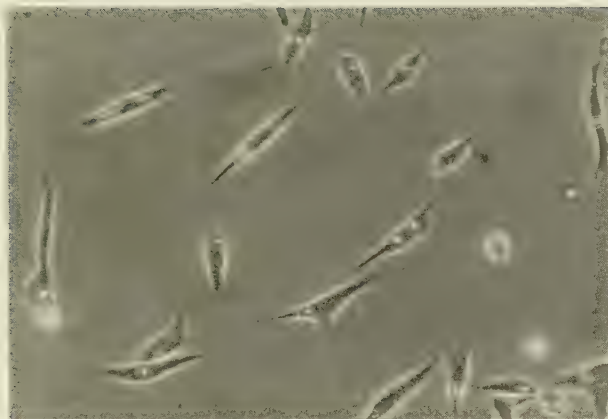
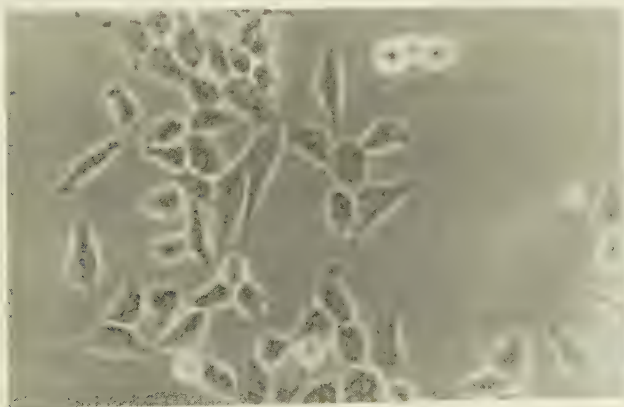


Abb. 33

Phasenkontrastaufnahme von

- a) Hühnerchondrocyten, die 7 Tage mit Calvarien konditioniertem Medium (CKM) kultiviert wurden und dadurch fibroblastenähnliche Gestalt gewinnen.
- b) Chondrocyten, die 7 Tage mit Sterna konditioniertem Medium (SKM) kultiviert wurden. Im Vergleich zu Kontrollen sind die Zellen flacher und mehr polygonal.



macht. Außerdem wurde in dieser Versuchsreihe gefunden, daß Erhitzen der konditionierten Medien auf 60°C über eine Stunde keinen Verlust an biologischer Aktivität zur Folge hat.

Tabelle 8

Fraktionen des konditionierten Mediums von Calvarien und ihre biologische Aktivität im Stoffwechsel von Chondrocyten

| | Morphologie | Anhaf-
ten | Wachs-
tum | Protein
synthese | Kollagen | Umschal-
ten |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------------|----------|-----------------|
| Gesamt CKM | fibroblastoid | ++ | +(-) | - | - | +++ |
| Dialysiert | fibroblastoid | ++ | + | n.b. | + | ++ |
| >300 000 MG | fibroblastoid | + | + | - | - | ++ |
| <300 000 MG | rund | - | - | + | + | - |

Tabellen 6, 7 und 8 legen die Erklärung nahe, daß das Anhaften der Zellen an der Petrischale Voraussetzung für die Umschaltung ist. Da weiterhin ein Faktor mit einem Molekulargewicht von über 300 000 Dalton als aktiv erkannt wurde, sollte nachgesehen werden, ob Fibronectin -der Faktor, der wesentlich an der Zellanhftung beteiligt ist (66)- sich in konditionierten Medien angereichert vorfindet. Wie die Abb. 34 mit dem Bandenmuster der Disc-Elektropherogramme von verschiedenen konditionierten Medien jedoch zeigt, ist Fibronectin nicht in nennenswerten Mengen dort nachzuweisen. An dieser Stelle ist nochmals auf Tabelle 7 zu verweisen, die zum Ausdruck bringt, daß das Medium konditioniert durch konfluente Chondrocytenkulturen zwar günstig für das Absetzen der Zellen ist, nicht aber die Umschaltung auf Typ I Kollagen beschleunigt.

Der bekanntlich große Einfluß von Serumkomponenten auf Zellwachstum und Stabilität der Genexpression wurde deutlich als foetales Kälberserum gegen Hühnerserum ausgetauscht wurde, so daß sich die Hühnerchondrocyten im homologen Serum befanden.

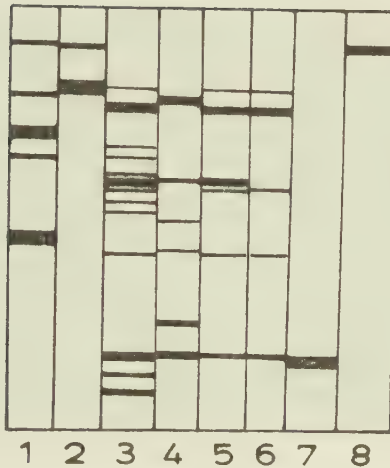


Abb. 34

Bandenmuster der SDS-Slabgelelektrophorese von
1) Hühnerserum, 2) Typ II Kollagen aus lathyritischen
Hühnersterna, 3) Calvarien konditioniertes Medium (CKM),
4) Sterna konditioniertes Medium, 5) CKM Fraktion <300 000 MG,
6) CKM Fraktion >300 000 MG, 7) Col 1 Peptid (MG 10 000),
8) Fibronectin.

Dazu wurden primäre Chondrocyten in mittlerer Zelldichte in Petrischalen ausgesät und entweder mit 10 % FKS oder 10 % Hühnerserum über 17 Tage, ohne trypsinisiert zu werden, kultiviert. Wie Abb. 35 zeigt, ist die Morphologie der Zellen sehr ähnlich der von Fibroblasten. Nach 7, 12 und 17 Tagen wurde im Anschluß an einen 24-Stunden-Puls mit ^3H -Prolin der Anteil an Typ I Kollagen bestimmt. Abb. 36 zeigt, daß die mit Hühnerserum kultivierten Chondrocyten einen wesentlich höheren Anteil an Typ I Kollagen aufweisen (70 %) als Chondrocyten, die in FKS kultiviert wurden (25 %).

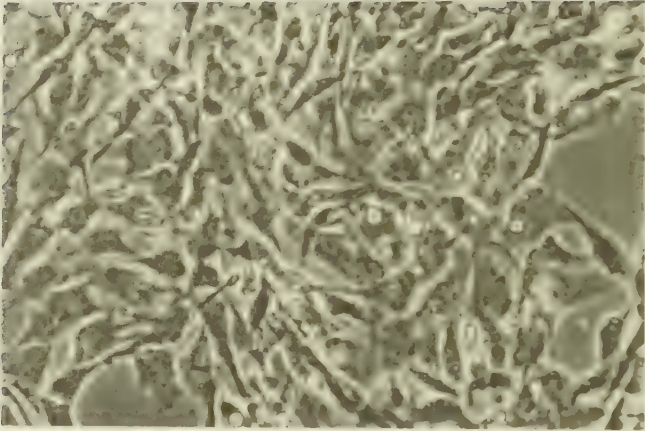


Abb. 35

Phasenkontrastaufnahme von Hühnerchondrocyten, die für 8 Tage mit Hühnerserum kultiviert wurden.

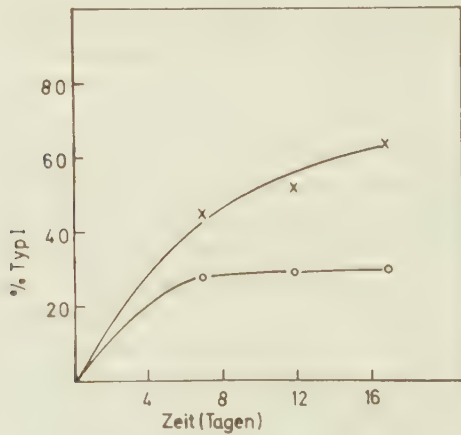


Abb. 36

Umschaltkurve von Hühnerchondrocyten, die mit 10 % Fks (o-o-o) und 10 % Hühnerserum (x-x-x) kultiviert wurden.

Die Umschaltung auf die Synthese von Typ I Kollagen ist danach um den Faktor 2 - 3 beschleunigt. In beiden Fällen wird aber auch deutlich, daß Plateauwerte des Kollagentypenverhältnis erreicht werden, eine Beobachtung, die mit Erreichen der Konfluenz korreliert ist. Sobald die Zellen nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen, stellen sie auch das Umschalten in der Kollagensynthese ein.

Zusammenfassung der Ergebnisse in Teil III

1. Verschiedene exogene Faktoren können das Umschalten der in vitro kultivierten Chondrocyten auf die Typ I Kollagensynthese beschleunigen, wobei meist eine Beschleunigung des Wachstums und eine Senkung der Kollagensyntheserate eingeschlossen ist.
2. Die von Calvarien, Sterna und Fibroblasten in Monolayer konditionierten Medien, 1 : 1 verdünnt mit Hams F-10 Medium und in Gegenwart von FKS, induzieren die Typ I Kollagensynthese in Chondrocyten. Der "Dedifferenzierungsfaktor" aus CKM und FKM ist hitzestabil und besitzt ein Molekulargewicht von über 300 000 Dalton.

DISKUSSION

Ein polyfunktionelles Individuum benötigt zu seiner Entwicklung die Möglichkeit der gewebe- und organabhängigen Differenzierung pluripotenter Stammzellen. Ist ein bestimmter Funktionszustand aber erreicht, so werden offensichtlich Mechanismen in Gang gesetzt, die diese optimale Entwicklungsstufe stabilisieren können.

Steckt man aus dieser Perspektive den Rahmen der vorliegenden Arbeit ab, so umschließt er einerseits die Frage nach der Regulation der Genexpression einer differenzierten Eukaryontenzelle und weist andererseits auf die Konfrontation mit dem medizinisch bedeutsamen Syndrom der progressiven Zerstörung von Knorpelgewebe im Krankheitsbild der Osteoarthritis hin (69 - 72). Wird die Problemstellung präzisiert, so ist in beiden äußerst komplexen Ausgangssituationen eine umkehrbare Thematik erkennbar, nämlich durch welches Wechselspiel erzielt der Organismus in einer bestimmten Funktionseinheit (Organ, Gewebe) eine flexible, jedoch konsequente Einhaltung eines physiologischen "Kurses", oder - von der anderen Seite her betrachtet - warum kommt es in manchen Krankheiten zu offensichtlich irreversiblen "Kursabweichungen"?

A Dedifferenzierung in vitro

Während der Verlust an organspezifischer Differenzierung nur selten in Krankheitsbildern direkt erkennbar ist, ist schon seit langer Zeit bekannt, daß Organe oder daraus isolierte Zellen unter in vitro Kulturbedingungen nur sehr begrenzt ihre Funktionsfähigkeit beibehalten (72). Knorpelgewebe und daraus isolierte Zellen verhalten sich in dieser Hinsicht ganz entsprechend, d.h. sie sind in vitro einem fortschreitenden Prozeß der "Dedifferenzierung" unterworfen (24 - 26). Dieser Begriff ist eher beschreibend, als deutend zu verstehen.

Während sich der differenzierte Zustand der Chondrocyten im Knorpel durch die hohe Syntheserate der "Luxusprodukte", den Proteoglycanen und dem Kollagen Typ II (72), und einer geringen Teilungsrate auszeichnet, verschiebt sich unter den in vitro Kulturbedingungen das qualitative und quantitative Synthesemuster von Pg und Kollagen. Bemerkenswert für die in vitro Kultur ist dazuhin einerseits die Synthese des Zelloberflächenproteins, Fibronektin, das im Organ nicht nachweisbar ist (73), sowie andererseits die gesteigerte Zellteilungsrate.

Diese Beobachtungen in der in vitro Zellkultur geben die Möglichkeit in die Hand, durch Manipulation der äußeren Kulturbedingungen den Vorgang der Dedifferenzierung zu verlangsamen oder aber zu beschleunigen, um damit das "Wesen" eines differenzierten Zustandes besser verstehen zu können.

Inhalt der beiden ersten Abschnitte - und nun erster Gegenstand der Diskussion - waren jedoch Versuche mit dem Ziel, die empirische Basis des "Dedifferenzierens" von Chondrocyten zu erweitern. Der differentiellen Analyse der Kollagensynthese sowohl in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht wurde hierbei ähnliche Bedeutung beigemessen, wie etwa dem Vergleich "umprogrammierter" Chondrocyten mit primären Chondrocyten und Fibroblasten hinsichtlich ihrer Zelloberfläche oder ihrer Zellteilungsrate.

Umgeschaltete Chondrocyten synthetisieren mindestens 3 verschiedene Kollagentypen

So konnte gezeigt werden, daß Chondrocyten nicht nur auf die Synthese von Typ I Kollagen umschalten, sondern daß in zeitlicher Verzögerung auch die Synthese von Typ III nachgewiesen werden kann (Abb. 13 und 14, S. 22).

Daneben konnten in dieser Arbeit Hinweise gewonnen werden, daß beim Umschalten von Hühnerchondrocyten in Monolayer-

kultur eine Kollagenkette synthetisiert wird, die noch nicht näher charakterisiert ist. Dieser bisher nur bei dedifferenzierenden Hühnerchondrocyten beobachtete Kollagentyp eluiert bei der Chromatographie an CM-Cellulose vor der α_2 Kette und erweist sich bei der Rechromatographie an Agarose als α Kette (Abb. 15, S. 23).

Da Typ III Kollagen von Huhn, als trimere Komponente im abfallenden Teil des α_2 -Peaks eluiert, ist dieser "neue" Kollagentyp nicht mit Typ III gleichzusetzen (39). Da auch der Hydroxylierungsgrad - zwischen Typ I und II liegend - keine eindeutige Identifizierung ermöglicht, wird es erst mit Hilfe von BrCN-Peptiden möglich sein zu entscheiden, ob diese Kollagenkette mit Typ V Kollagen (74) oder mit dem kürzlich von Cheung beschriebenen Kollagentyp identisch ist (34, 75).

Im Laufe des Umschaltens ändert sich die Menge des synthetisierten Kollagens

Neben den qualitativen Veränderungen im Kollagentypenmuster sind aber auch die Verschiebungen im quantitativen Bereich der Kollagensynthese von grundlegendem Interesse.

Während ein quantitatives Erfassen des Kollagens (Hydroxyprolin - Bestimmung, Kollagenase - Empfindlichkeit, chromatographische Methoden) vergleichsweise spezifisch und reproduzierbar ist, bringt die Bestimmung des nichtkollagenen Anteils wesentlich mehr Probleme mit sich. Außerdem sollte man nicht vergessen, daß die Stabilisierung der Quantität eines Genproduktes noch sehr viel empfindlicher von "Umwelt"-Veränderungen abhängig ist, und daß Unterschiede von Spezies zu Spezies vorliegen können.

Ähnlich verhalten sich Chondrocyten in vivo und in vitro. Organähnliche Verhältnisse, z.B. frisch isolierte Kalbschondrocyten in Suspension oder konfluentem Monolayer, synthetisieren relativ viel Kollagen (ungefähr 15 - 30 % des Gesamtproteins (31)). Dagegen fällt die Kollagensyntheserate der Chondrocyten, die in Monolayerkultur mit 10 % FKS die Möglichkeit zur Zellteilung haben, auf ungefähr 2 % des Gesamtproteins ab, um sich parallel zum Umschaltvorgang langsam auf einen Wert um 5 % einzupendeln (Abb. 16, S. 24). Inwieweit dieser Wert von der Serumkonzentration und der Teilungsaktivität der Zellen abhängig ist, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Es ist vorstellbar, daß bei starker Proliferation, hervorgerufen durch Wachstumsfaktoren im Serum, die Synthese der "Luxusproteine" zu gunsten der für den normalen Zellmetabolismus notwendigen Proteine eingestellt wird.

So konnte der Einfluß der Kulturbedingungen, besonders des Serums, im Medium auf die Teilungs- und Proteinsyntheserate der Fibroblasten in Kultur von verschiedenen Autoren gezeigt werden (76, 46, 44). In der Sehne, d.h. dem Organ, stellt das Kollagen 30 % des Proteins dar, während konfluente Sehnenfibroblasten, die mit 10 % FKS kultiviert werden, nur 2 - 5 % Kollagen synthetisieren. Bei Kultivation der Zellen in hoher Dichte und geringer Serumkonzentration (0.5 %) kann jedoch ein Zustand wie in vivo beibehalten werden (77).

Umgeschaltete Chondrocyten bauen Kollagen ähnlich ab wie Fibroblasten

Es war nun interessant zu untersuchen, ob parallel zur Kollagensyntheseänderung der Chondrocyten beim Umschalten auch der Katabolismus sich verändert. Denn neben der Synthese charakterisiert das Degradationsverhalten einen Zelltyp hinsichtlich seiner metabolischen Aktivität. Kollagenabbau, durch Kollagenasen oder durch Kathepsin B (80) katalysiert, kann spezifisch anhand des dialysablen Hydroxyprolins verfolgt werden. Da bei Chondrocyten im Lauf der Dedifferenzierung

weniger Hydroxyprolin im Dialysat nachweisbar ist, gleichen sich dedifferenzierte Chondrocyten in ihrem katabolischen Verhalten den Fibroblasten an (Tab. 5, S. 39). Ob diese Abnahme des Kollagenabbaus auf eine Verringerung der Proteaseaktivität zurückzuführen ist, oder ob Typ I Kollagen in stabilerer, Protease resistenterer Form an der Zelloberfläche abgelagert wird, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

Die Bindung von Con A weist auf einen intermediären Zustand umgeschalteter Chondrocyten hin

Änderungen in Membraneigenschaften spiegeln oft einen Wechsel der allgemeinen Zellphysiologie wieder und können sich auch in einer geänderten Morphe äußern. So ist bekannt, daß die Membran im Laufe der Differenzierung gewebespezifischen Anpassungen unterworfen ist (81), oder daß die Transformation von Zellen schnell am Verlust oder Auftreten neuer antigener Determinanten an der Oberfläche erkennbar wird (82).

Neben der hier angedeuteten immunologischen Oberflächencharakterisierung kann das Bindungsverhalten gegenüber Pflanzenlektinen als charakteristisches Indiz einer Oberflächenstruktur gewertet werden (45). In niedrigen Konzentrationsbereichen des angebotenen Concanavalin A, in denen nur die Bindungsstellen mit hoher Affinität belegt werden, zeigen dedifferenzierte Chondrocyten eine höhere Adsorptionsfähigkeit von Con A als primäre Chondrocyten, während in hohen Konzentrationsbereichen der Vergleich zwischen dedifferenzierten und primären Chondrocyten und Fibroblasten deutlich macht, daß weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen Chondrocyten und Fibroblasten besteht (Abb. 25 und 26, S. 41 und 42).

Der umgeschaltete Zustand der Chondrocyten
ist nicht revertierbar

Der Frage, ob dedifferenzierte Chondrocyten ihren ursprünglichen "Status" wieder zurückerlangen können, - und damit revertierbar wären - galten die Versuche der Resuspension. Die Suspensionskultur stellt nämlich ein Kultursystem dar, das bei primären Chondrocyten deren Differenzierungszustand begünstigt. Im Falle des Vergleichs von Fibroblast, Chondrocyt und dedifferenziertem Chondrozyt scheinen die letzteren ein den Fibroblasten ähnliches Verhaltensmuster angenommen zu haben, das sich folgendermaßen darstellt:

Als Folge der Resuspension reduziert sich die Kollagensynthese von Fibroblasten und dedifferenzierten Chondrocyten auf weniger als die Hälfte. Von diesen dedifferenzierten Chondrocyten, die in Monolayer um die 70 % Typ I Kollagen synthetisiert haben (Tab. 4, S. 37), wird jetzt nur Typ II Kollagen synthetisiert. Diese restliche Kollagensynthese in Suspension entspricht relativ genau dem Anteil des Typ II Kollagens, der im Monolayer synthetisiert wird. Primäre Chondrocyten zeigen hingegen weder in Bezug zur Quantität noch zum Kollagentyp charakteristische Unterschiede zwischen Monolayer und Resuspension (Abb. 23, 24, S. 37, 38). Daraus kann geschlossen werden, daß die Resuspension ein Überleben nur der Typ II Kollagen synthetisierenden Zellen zuläßt und Typ I Kollagen synthetisierende Zellen inaktiviert.

Während die hier geschilderten quantitativen Versuche darauf hindeuten, daß infolge einer drastischen Syntheseminderung - als Folge des Trypsinisierens und der Suspensionskultur - kein Rückschalten erfolgt, sondern die Produktion von Typ I Kollagen ausfiel, glauben Deshmukh und al. sowie Mayne et al. Anzeichen dafür zu haben, daß dedifferenzierte Chondrocyten auch wieder zu ihrem ursprünglichen Zustand "revertieren" können. In Abhängigkeit von der Verwendung von Ca^{2+} im

Resuspensionsmedium (Deshmukh 79,68) oder nach Austausch des Kulturmediums mit Embryoextrakt gegen Normalmedium (Mayne 67) beobachteten diese Laboratorien einen neuerlichen Anstoß der Typ II Kollagensynthese. Inwieweit diese Forscher die quantitativen Aspekte berücksichtigen, kann den Veröffentlichungen nicht entnommen werden.

Wie kann der zeitliche Verlauf des Umschaltens der Chondrocyten gesehen werden?

Wie die Versuche des ersten Ergebnisteils zeigten, schalten Hühnerchondrocyten in Monolayerkultur graduell über einen Zeitraum von 4 Wochen auf die Synthese von Typ I Kollagen um. Es stellte sich nun die Frage, ob dieses Phänomen das Verhalten der Zellen in Massenkultur widerspiegelt, oder auch das jeder einzelnen Zelle. Versuche an Einzelzellkulturen und mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik, die zeigten, daß nur sehr wenige Zellen gleichzeitig Typ I und II Kollagen synthetisieren, legen es nahe, das Umschalten als einen "schlagartigen" Prozeß aufzufassen (62). In der Massenkultur lassen sich neben dem Umschalten der Kollagensynthese noch weitere Veränderungen des Zellstoffwechsels beobachten, die jedoch nicht auf der Ebene der Einzelzelle zu verfolgen sind. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß sie nicht einem gleichzeitigen "an - aus" Mechanismus unterworfen sind, sondern daß sie nach einem bestimmten zeitlichen Schema ablaufen. Ein zeitabhängiges Verlaufsschema der Dedifferenzierung könnte folgendes Aussehen haben:

Veränderung der Zelloberfläche (bedingt durch enzymatische Isolierung) - - - Verlust der charakteristischen Morphe
- - - Steigerung der Proliferation - - - neue Ebene für
Synthese und Degradation - - - Umschalten von Typ II auf I
und danach auf Typ III Kollagen.

Das Einsetzen dieser Prozesse ist allerdings nicht als streng nacheinander ablaufend zu verstehen, sondern in zeitlicher Überlappung zu sehen. Ob diese beobachteten Veränderungen eine

kausale Voraussetzung oder Bedingung für das Umschalten sind, sollte durch Einflußnehmen auf diese Zellcharakteristika, wie sie in Teil III der Ergebnisse dargestellt sind, ergründet werden.

B Beeinflussen des Umschaltens

Schon die ersten in vitro Untersuchungen mit Knorpelzellen haben deutlich gemacht, daß sich Kontakt und Kommunikation zwischen den Zellen stabilisierend auf die Genexpression auswirken (72). Verfolgt man nämlich die Synthese von Typ II Kollagen und das Proteoglycanmuster als ein Ausdruck des differenzierten Zellzustandes, so kann man zeigen, daß die Chondrocyten im Organ oder aber als dichter Zellrasen dieses Knorpelcharakteristikum beibehalten (31). Beiden Bedingungen sind wohl mindestens zwei Dinge gemeinsam, erstens, daß eine extrazelluläre Matrix erhalten blieb (im Organ) oder aber sich rasch wieder ausbilden konnte (im dichten Monolayer) und zweitens, daß sich die Zellen praktisch nicht teilen.

Andererseits konnten diese Untersuchungen aber auch zeigen, daß isolierte Chondrocyten - als dünne Monolayer ausgesät - schnell ihren differenzierten Zustand verlieren und auf die Synthese von Typ I Kollagen umschalten. Unter diesen Bedingungen durchlaufen die Zellen in rascher Folge Teilungszyklen und sind außerdem aufgrund fehlender, direkter Nachbarn nicht in der Lage, sich ein adäquates extrazelluläres Milieu zu schaffen. Die weitere Beobachtung, daß frisch isolierte Zellen, wenn sie in Suspensionskultur gehalten werden, ihren Differenzierungszustand beibehalten, läßt sich damit erklären, daß die Zellen nur geringe Teilungsaktivität zeigen, und daß sie durch die Bildung von Aggregaten organähnliche Eigenschaften (bezüglich Kontakt und Aufbau einer Matrix) zurückgewinnen.

Durch direktes Einflußnehmen und Veränderung dieser Parameter wurde untersucht, inwieweit diese Punkte für die Änderung der Genexpression beim Umschalten notwendig und hinreichend sind. Eingeteilt in 3 Gruppen werden die Ergebnisse des 3. Teils

in ihrer Bedeutung für die Zellteilung, die Bildung der extrazellulären Matrix und das Anhaften diskutiert.

I. Umschalten bei vermehrter Zellteilung, bei beeinträchtigter Matrixbildung und Anhaften am Substrat

Erneute Behandlung von Chondrocyten mit Trypsin, ihre Kultivierung in der Gegenwart von Hühnerserum oder konditionierten Medien, die Behandlung mit BUDR, sowie das Aussäen in sehr geringer Zelldichte, stellen Bedingungen dar, unter denen sich Chondrocyten einerseits an Oberflächen festhalten können und eine erhöhte oder normale Proliferationsrate aufweisen, andererseits aber in der Matrixbildung beeinträchtigt erscheinen. Gerade unter diesen Voraussetzungen wird der Umschaltvorgang am eindruckvollsten beschleunigt (Tab. 6, S. 53).

Unter den hier aufgereihten Kulturvarianten verdienen der Zusatz von Hühnerserum anstelle von foetalem Kälberserum, sowie die Gegenwart von konditionierten Medien besondere Beachtung, da sie sehr rasch die Synthese von Typ I Kollagen induzieren. Hühnerserum wie konditionierte Medien stellen physiologische Produkte dar (im Gegensatz zum BUDR), wobei im Falle des Serums dessen Spezieshomologie zum Zellsystem (Hühnerserum - Hühnerchondrocyten), im Falle der konditionierten Medien, deren Ursprung von Typ I Kollagen synthetisierenden Systemen hervorzuheben sind.

Die letztere Homologie war ausschlaggebend bei der Konzeption eines Versuchs, der die Frage beantworten sollte, ob ein Typ I Kollagen synthetisierendes System Faktoren produziert, die die Synthese desselben Kollagentyps besonders fördert oder induziert. Die Ergebnisse, die in Tab. 7 und Abb. 33 dargestellt sind, deuten an, daß Chondrocyten, die mit Calvarien konditioniertem Medium kultiviert werden, morphologisch und in ihrer Kollagensynthese Fibroblasten sehr ähnlich sind.

Die noch unvollständige Analyse der aktiven Anteile, die in konditionierten Medien vorliegen, haben ein Molekulargewicht von $>300\ 000$ nahegelegt und außerdem eine beachtliche Hitzestabilität (60°C) angezeigt. Da die Fraktion $>300\ 000$ bei der Elektrophorese sich in Banden niedrigeren Molekulargewichte aufspaltet, kann man annehmen, daß der native Komplex unter dem Einfluß von SDS dissoziiert wird. Die Disk-elektrophorese hat weiterhin wahrscheinlich gemacht, daß das Oberflächenprotein Fibronectin vermutlich nicht die aktive Substanz darstellt, da sie nicht im konditionierten Medium nachweisbar war.

II. Umschalten bei verringerter Zellteilung

Die Senkung des pH-Werts, der Zusatz von Vitamin A und Hydroxyharnstoff zum Kulturmedium waren gewählt worden, um die Zellteilung zu unterdrücken, ohne das Anhaften der Zellen zu beeinträchtigen. In allen drei Fällen wird trotzdem ein Umschalten auf die Synthese von Typ I Kollagen beobachtet, was darauf schließen läßt, daß die Proliferation der Zellen keine notwendige Voraussetzung zur Änderung der Genexpression ist.

Inwieweit die Kultivierung in der Gegenwart von Hydroxyharnstoff ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Matrixbildung führt, läßt sich nicht mit letzter Sicherheit entscheiden. Der gesteigerte Prolineinbau scheint eher das Gegenteil anzudeuten. Die Blockierung der DNA-Synthese (über die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase) macht sich ganz eindeutig in einer auffallenden morphologischen Wandlung zu Riesenzellen bemerkbar (Abb. 37).



Abb. 37

Phasenkontrastaufnahme von Hühnerchondrocyten, die 7 Tage als Monolayer mit Hydroxyharnstoff ($10^{-4}M$) kultiviert wurden.

Bezüglich dieses Phänomens der zellulären "Monsterbildung" gleichen die Hydroxyharnstoff behandelten Chondrocyten Fibroblasten, die bereits den Endzustand des Alterns erreicht haben (83). Für seneszente Chondrocyten hatte bereits Mayne et al. die Synthese von Typ I Kollagen nachgewiesen, wobei zusätzlich Moleküle der Kettenzusammensetzung $(\alpha_1(I))_3$ auftraten (84).

III. Umschalten bei verringerter Zellteilung und verhindertem Anhaften

Da schließlich in Suspensionskultur, induziert durch BUDR oder Faktoren konditionierter Medien eine Dedifferenzierung von Chondrocyten möglich ist, scheint auch das Anhaften der Zellen am Substrat für das Umschalten nicht notwendig zu sein, vielmehr unterstreichen diese Versuche umso viel mehr die zentrale Bedeutung der extrazellulären Matrix, deren Bildung auch unter diesen Versuchsbedingungen beeinträchtigt ist.

Abb. 38 stellt diese Abhängigkeit des Umschaltens von der Proliferation, von der Ausbildung einer extrazellulären Matrix und vom Anhaften der Zellen in den angeführten Versuchen nochmals zusammenfassend dar. In ihr wird auch nochmal die zentrale Bedeutung der extrazellulären Matrix hervorgehoben, da allein ihre Beeinträchtigung in der dritten Gruppe ein Umschalten bewirken kann.

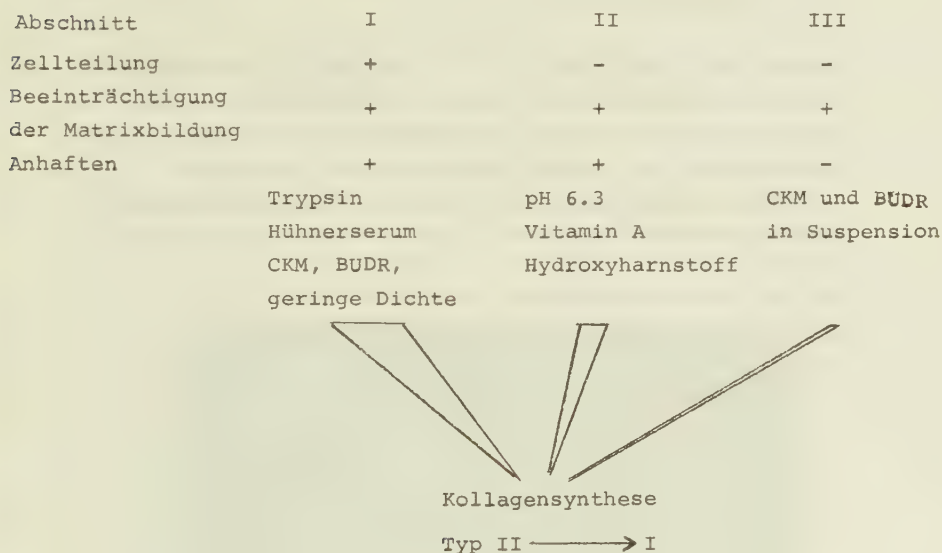


Abb. 38

Drei physiologische Parameter (Zellteilung, Beeinträchtigung der extrazellulären Matrix, das Anhaften der Zellen am Substrat) scheinen bei verschiedenen Kulturbedingungen wesentlich für das Umschalten der Chondrocyten zu sein. Die Ziffern I, II und III beziehen sich auf die diskutierten Abschnitte.

Weitere ergänzende Hinweise für den Einfluß der extrazellulären Matrix lassen sich aus folgenden Beobachtungen ziehen, bei denen das Umschalten an den Verlust der extrazellulären Matrix gekoppelt zu sein scheint:

1. Wird in einem dichten Zellrasen von Chondrocyten eine "Wunde" gesetzt, indem Zellen mechanisch entfernt werden, so wachsen vom Rand der "Wunde" fibroblastoide Zellen in die freie Fläche ein.
2. Analog werden die peripheren Zellen in einem Chondrocytenaggregat fibroblastoid und "dedifferenziert" während die zentralen Zellbereiche ihren Habitus als Chondrocyten wahren (37).
3. Werden von einem "nativen" Sternum die perichondralen Zellen entfernt und das "nackte" Sternum anschließend im serumhaltigen Medium kultiviert, so läßt sich bereits nach 2 Tagen ein "neues Perichondrium" anhand der Immunfluoreszenz mit Anti - Typ I Kollagen-Antikörpern nachweisen (Abb. 39).



Abb. 39

Immunfluoreszenzaufnahme eines mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen angefärbten Hühnersternums. Dem Sternum war zuerst durch Kollagenasebehandlung vollständig das Perichondrium entfernt worden. Nach 2tägiger Organkultur in serumhaltigem Medium kann an der Oberfläche des Sternums wieder eine Typ I Kollagen synthetisierende Schicht nachgewiesen werden.

C Ansatzpunkt der das Umschalten induzierenden Faktoren

Die im dritten Ergebnisteil unternommenen Versuche ließen es bisher zu, die Voraussetzungen und Bedingungen für ein rasches Umschalten von Chondrocyten einzugrenzen, doch sollten sie auch Hinweise zur Beantwortung einer der Kernfragen der Dedifferenzierung geben, ob nämlich eine interne Umprogrammierung der Zelle oder eine Umstrukturierung der Zelloberfläche als Primärereignis anzusehen ist.

I. Eingriff in die interne Programmierung der Zellen

Zur internen Umprogrammierung der Zellen boten sich drei Möglichkeiten an, die untersucht wurden.

Durch Hemmung der Transkription mit Aktinomycin C sollte versucht werden, die differenzierten Chondrocyten an m-RNA für Typ II Kollagen zu verarmen und nach Auswaschen des Antibiotikums die Transkription undifferenzierter Gene zu induzieren. Wenngleich die Angriffspunkte des Aktinomycin C in Eukaryonten nur unvollständig charakterisiert sind, ist doch sein inhibierender Einfluß auf die Synthese von m-RNA unbestritten, und von der Lokalisierung her als intern zu betrachten (42). Die wahrscheinliche Verarmung eines Chondrocyten an Typ II Kollagenmatritze nach Aktinomycingabe hatte allerdings nicht zur Folge, daß die Chondrocyten darin einen beschleunigenden Impuls zur Synthese von Typ I Kollagen erkannten. Da Aktinomycin C nur unvollständig aus den behandelten Zellen ausgewaschen werden kann - was sich auch in einer erheblich verminderten Synthese von Typ II Kollagen bemerkbar macht (Abb. 31, S. 50) - können erst Untersuchungen mit möglichst selektiv hemmenden und auswaschbaren Substanzen mehr Klarheit bringen, ob die Umschaltung von Chondrocyten gezielt intern induziert werden kann.

Die Wirkung des Thymidinanalogon BUDR auf die Änderung der Genexpression während der Differenzierung und Dedifferenzierung wurde von zahlreichen Autoren beschrieben und war nicht Gegenstand einer näheren Charakterisierung in dieser Arbeit (58 - 61). Der Angriffspunkt von BUDR an der DNA legt den Schluß nahe, daß eine interne Umprogrammierung der Zelle das Initialereignis der Dedifferenzierung darstellen könnte.

Unter den in Tab. 6 aufgezählten Faktoren kann auch das Vitamin A als eine zellintern wirkende Substanz angesehen werden. Als Destabilisator lysosomaler Membranen, kann es das Austreten degradativer Enzyme, wie Nukleasen und Proteasen, bewirken (55). Eine derartige Interpretation scheint auch dadurch gerechtfertigt, daß Deshmukh et al. gezeigt haben, daß die Behandlung von Knorpelgeweben mit lysosomalen Enzymen zur Zerstörung des extrazellulären Gefüges führt, in dessen Folge dann die Synthese von Typ I Kollagen beobachtet werden konnte (85).

II. Umstrukturierung der Zelloberfläche

Der besonders rasche Umschalteffekt der Medienfaktoren, die ein Molekulargewicht von größer 300 000 aufweisen, legt ihre Wirkung an der Zelloberfläche nahe, doch können das die bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig beweisen. Es wäre allerdings vorstellbar, daß die an der Oberfläche abgelagerten Faktoren das Zusammenklumpen der Zellen verhindern, so daß die Einzelzellen keine Matrix ausbilden können - und umschalten.

Der Verlust an Matrix oder deren unzulängliche Rekonstitution weisen zurück zu dem einleitend angeführten Problem der degenerativen Osteoarthritis. Ausgelöst vermutlich durch erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme werden Proteoglykane abgebaut, so daß Textur und Gefüge des Knorpels verloren gehen (86). Wie Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen,

finden sich in den betroffenen Gebieten Herde von Chondrocyten, die in ihrer Kollagensynthese auf Typ I umgeschaltet haben (71), wobei gleichzeitig eine starke Proliferation erkennbar wurde. Inwieweit der augenscheinlichen Parallelität von in vitro Versuchen und in vivo Degeneration gleiche molekularbiologische Mechanismen zugrunde liegen, muß noch offen bleiben.

Der Status einer differenzierten Zelle, hier des Chondrocyten, ist vermutlich in ein Netz von Kontrollmechanismen verwoben, wobei die Regulation der Zell-Zell-Wechselwirkung, der Proliferation und der Ausbildung einer extrazellulären Matrix für Chondrocyten ein wesentlicher Mechanismus zum Aufrechterhalten der differenzierten Funktion zu sein scheint (Abb. 40).

Im Organ

Im matrixfreien
Verband

Im dedifferen-
zierten Zustand

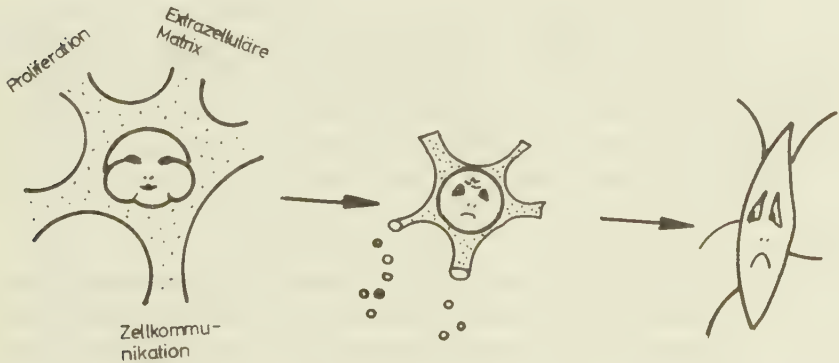


Abb. 40

Chondrocyten im differenzierten Zustand sind durch einen festen Kontakt zu anderen Zellen und ihre schützende extrazelluläre Matrix verbunden. So können die die Genexpression stabilisierenden Faktoren (ooo) von der Zelle festgehalten werden. Durch Desaggregation des Gewebes und anschließende Zellteilung wird die extrazelluläre Matrix abgebaut und nicht mehr adäquat gebildet. Dabei gehen die stabilisierenden Faktoren verloren.

Kommt es in einem dieser Bereiche zu Veränderungen, so zeichnet sich ein Dedifferenzierungsprozeß ab. Der Verlust einer dieser Kontrollmechanismen kann jedoch bisher als weder hinreichend noch als notwendig zum Umschalten der Kollagensynthese betrachtet werden. Es ist allerdings vorstellbar, daß während der Dedifferenzierung verschiedene Phasen durchlaufen werden, die unterschiedlich stabil sind, so daß ein Revertieren möglich ist (87).

Die Hoffnung, daß die Erklärung des Problems der Dedifferenzierung von medizinischer Bedeutung sein wird, gründet sich darauf, daß das in vitro Umschalten von Chondrocyten Modellcharakter für den pathophysiologischen Vorgang der progressiven Knorpelzerstörung besitzt. Jede Information, die zur Erweiterung des in vitro Modells führt, kann dann einen positiven Einfluß auf die Diagnose und den Krankheitsverlauf derartiger Knorpelerkrankungen haben.

Zusammenfassung

1. Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß isolierte Chondrocyten in Monolayer kultiviert auf die Synthese von Typ I und III Kollagen bzw. eines noch nicht näher charakterisierten Typs umschalten. Der Prozeß der Dedifferenzierung zeichnet sich neben Veränderungen der Morphologie durch die Abnahme der Kollagensynthese aus. Man findet nämlich bei noch differenzierten Chondrocyten einen hohen Kollagenanteil, der bei Monolayerkultivation stark absinkt und sich im Laufe der Dedifferenzierung auf den Fibroblasten entsprechende Werte einstellt (Abb. 16). Dabei sind Hinweise vorhanden, daß zwischen Kalbs- und Hühnchondrocyten Unterschiede im zeitlichen Verlauf auftreten können.
2. Der Vergleich Chondrocyten - dedifferenzierte Chondrocyten - Fibroblasten zeigt, daß der umgeschaltete Chondrocyt in Morphologie, Wachstumsverhalten, qualitativer und quantitativer Kollagensynthese dem Fibroblasten sehr ähnlich ist. Ein Rückschalten auf die Typ II Kollagensynthese war unter den hier verwendeten Kulturbedingungen nicht möglich (67, 68).
3. Der Umschaltprozeß läßt sich durch verschiedene Faktoren und Veränderungen der Kulturbedingungen beeinflussen. Eine Beschleunigung der Induktion der Typ I Kollagensynthese konnte sowohl durch wachstumstimulierende wie wachstumshemmende Faktoren erreicht werden, so daß die Zellteilung für das Umschalten keine essentielle Voraussetzung ist.

Die verwendeten Kulturbedingungen haben die Bedeutung der extrazellulären Matrix unterstrichen und die Zellteilung wie das Anhaften der Zellen am Substrat als weder hinreichend noch notwendig zum Umschalten ansehen lassen.

Konditionierte Medien von Typ I Kollagen synthetisierenden Systemen enthalten Faktoren (MG > 300 000), die hitzestabil sind und das Umschalten um den Faktor 3 beschleunigen können. Die geschilderten Versuche mit CKM lassen noch keine Entscheidung zu, ob der primäre Ansatzpunkt intra- oder extrazellulär anzusehen ist.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

I. Material

a) Chemikalien für die Gewebekultur:

L-Ascorbinsäure-Natrimsalz von Fluka AG, Buchs;
β-Aminopropionitril (BAPN)-fumarat von Serva; Penicillin von Hoechst; Penicillin/Streptomycin von LS-Labor Service, München; L-Glutamin LS Labor Service; Aktinomycin C₁ und Cycloheximid von Boehringer; 5-Bromo-2'-De oxyuridin (BUDR) von Boehringer; Concanavalin A (Con A) von Sigma; α-O-Methylmannosid von Fluka AG, Buchs; Retinolacetat (Vitamin A) von Sigma; N²-2'O-Dibutyryl-guanosin 3':5-monophosphat, cyclisch (cGMP) und N²-2'O-Dibutyryl-adenosin-3':5'-monophosphat, cyclisch (cAMP) von Boehringer; Collagenase von Worthington; Trypsin und EDTA von LS Labor Service; foetales Kälberserum (FKS) von LS Labor Service; Hühnerserum von Gibco Biocult.

Chemikalien für chemische Untersuchungen:

CM-Cellulose von Whatman; Agarose 5 von Biorad; Bio-Gel P-2 von Biorad; Acrylamid von Serva; Pepsin von Boehringer; Hyaluronidase von Sigma; Coomassie-Blau von Serva; Hyamin von Koch-Light Laboratories; Sodiumdodecylsulfat (SDS) von Serva; Szintigel von Roth; 2,5-Diphenyloxazol (PPO) von Merck.

b) Radioisotope:

[2,3 ³H(N)]-L-Prolin 20 - 40 Ci/mmol, [³⁵S]-L-Cystein 44 Ci/mmol, [4,5 ³H(N)]-L-Lysin 53.5 Ci/mmol, Uridin [5-³H] 27 Ci/mmol, Thymidin [6-³H] 10 - 15 Ci/mmol, Concanavalin A [acetyl-³H]-N-Acetylated 28.97 Ci/mmol.

- c) Medien: Für Chondrocyten: Hams F-10 von LS Labor Service mit Zusätzen
Für Fibroblasten: MEM Dulbecco von LS Labor Service mit Zusätzen
Zusätze: Natriumascorbat (50 µg/ml) als Cofaktor für die Peptidylprolinhydroxylase, Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml), L-Glutamin (200mM), 10 % foetales Kälberserum.
- Inkubationsmedium: MEM Dulbecco, BAPN (150 µg/ml), um die Quervernetzungen zwischen den Kollagenmolekülen zu verhindern (88), Natriumascorbat (50 µg/ml), Penicillin (400 U/ml).
- Radioaktives Inkubationsmedium:
Inkubationsmedium, ^3H -Prolin (10 µCi/ml). Bei Markierungen mit anderen radioaktiven Substanzen wurden entsprechende Mangelmedien verwendet.
- Konditionierte Medien: 100 Calvarien (CKM) oder 50 Sterna (SKM) wurden in 20 ml Inkubationsmedium im Erlenmeyerkölbchen über 24 h bei 37° geschüttelt. Konfluente Hühnerfibroblasten (FKM) und Hühnerchondrocyten (ChKM) konditionierten das Inkubationsmedium in Flaschen über 24 h. CKM und FKM wurden mit Membranfiltern (Berghof BM 3 000) in Fraktionen $\geq 300\ 000$ Molekulargewicht getrennt.
- d) Gewebekulturgefäße: Petrischalen 10 cm Ø von Falcon, Gewebekulturflaschen 75 cm² von Falcon, Multitestplatten 7 mm, 16 mm Ø von Limbro.
- e) Tiere: Befruchtete und vorbebrütete Eier von der Brüterei Hölzel, Moosburg. Foetale Kälber vom lokalen Schlachthof. Kaninchen zum Immunisieren.

II. Methoden

A) Zur Charakterisierung der kollagensynthetisierenden Zellen

a) Gewinnung der Zellen aus dem Organ

Hühnerchondrocyten wurden aus den Sterna 17tägiger Embryonen isoliert. Die Sterna wurden mit einer Lösung aus Collagenase (0.1 %) und Trypsin (0.25 %) unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C behandelt, so daß nach 30 min das aus Fibroblasten aufgebaute Perichondrium abgebaut war. Diese Zellen wurden verworfen. Mit demselben Enzymgemisch wurde die Hauptbehandlung des Sternums über 90 min durchgeführt, bis das Organ ganz desaggregiert war (Ausbeute: 100 Sterna = 3×10^8 Zellen) (89).

Hühnerfibroblasten wurden aus Hühnersehnen durch Desaggregation mit der oben beschriebenen Enzymlösung gewonnen (Ausbeute: 100 Hühnerbeine = 7.5×10^8 Zellen) (89).

Kalbschondrocyten wurden aus dem Gelenksknorpel foetaler Kälber gewonnen. Kleine Knorpelstücke wurden über Nacht in einer 0.25 % Collagenaselösung in Hams F-10 Medium (10 % FKS) inkubiert.

Kalbsfibroblasten wurden durch Auswachsen der Zellen aus Hautstückchen gewonnen.

Methoden nach Dehm (89), Cahn (90) und Wiebkin (91)

b) Kultivationsbedingungen:

1. Suspensionskultur:

10^5 - 10^6 Zellen/ml wurden nach CO₂ Begasung in einem 50 Ml Erlenmeyerkölbchen im Wasserbad bei 37°C geschüttelt oder in einem Gerät von Weaton auf dem Magnetrührer gerührt.

2. Monolayerkultur (ML):

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in einer Dichte von 10^6 in einer Petrischale mit 10 cm $\varnothing$ ausgesät. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Petrischalen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten.

3. Subkultivation:

Zur Propagation wurden die konfluenten Zellen mit einem 0,05 % Trypsin und 0.1 % EDTA Gemisch in PBS von der Petrischale heruntergelöst und in zwei Petrischalen wieder ausgesät.

c) Wachstumsbestimmung

1. Zellzahl:

10^6 Zellen wurden in Petrischalen (10 cm $\varnothing$) ausgesät und jeden zweiten Tag mit 1 ml 0.25 % Trypsin heruntergelöst und die Zellzahl mit Hilfe des Thoma Haemocytometer gezählt (Doppelbestimmung).

2. Thymidineinbau:

a) im Monolayer

Je 10^5 Zellen wurden in Petrischalen (3.5 cm $\varnothing$) ausgesät. Nach 3 Tagen wurden sie mit einem Puls von ³H-Thymidin (5 μ Ci/ml) in Hams F-10 (10 % FKS) markiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde der Einbau in die DNA mit eiskaltem PBS gestoppt, 3 x gewaschen. Eingebautes Thymidin wurde mit 1.5 % Perchlorsäure fixiert und 2 x damit gewaschen. Mit 70 % Äthanol wurden Zellipide abgelöst. Über 80 min wurde anschließend mit 5 % Perchlorsäure die DNA hydrolysiert und ihre Radioaktivität bestimmt. Es wurden jeweils 3 Petrischalen getrennt aufgearbeitet.

Methode nach Ball et al. (92).

b) in Suspension

10^5 - 10^6 Zellen/ml wurden mit ^3H -Thymidin (5 $\mu\text{Ci/ml}$) in Hams F-10 (10 % FKS) inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden 1 ml Fraktionen aus der Suspension entnommen, die Zellen auf einem Glasfaserfilter (Whatman GF/C) aufzufangen und wie oben beschrieben mit PBS, Perchlorsäure und Äthanol gewaschen und fixiert. Die Zellen auf den Filtern wurden mit Szintillationsflüssigkeit, die 1 % Hyamin enthielt, versetzt und ihre Radioaktivität gemessen. Bei der Messung des ^3H -Uridineinbaus wurde nach der gleichen Art vorgegangen.

d) Immunohistologische Färbung

Die Technik der indirekten Immunfluoreszenz wurde angewandt, um auf dem Niveau der Einzelzelle die Kollagentypen qualitativ zu bestimmen. Zur Immunisierung der Kaninchen wurden folgende Kollagentypen als Antigene verwendet:

Typ I aus Hühnerhaut

Typ II aus Hühnersterna durch schonenden Pepsinabbau

Typ I und Typ III aus Kalbshaut durch Neutralsalzlösung und fraktionierte Fällung (93)

Typ II aus hyalinem Gelenksknorpel des Kalbs durch schonenden Pepsinabbau (94)

Die Antisera wurden erst an heterologen Kollagentypen, die an Sepharose gebunden waren, adsorbiert. Eine weitere Reinigung wurde erreicht durch Adsorption an das homologe, trägergebundene Kollagen, von dem die Antikörper durch Elution mit 3 M NaSCN, 0.05M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{pH}6,0$ abgelöst wurden. Der Antikörpertiter wurde mit der passiven Hämagglutination bestimmt (95-98).

Bei der indirekten Immunfluoreszenztechnik werden Gewebsschnitte oder luftgetrocknete Monolayer mit typspezifischen Antikörpern für 30 min behandelt, der Überschuß an Antikörper mit PBS gewaschen und dann mit fluoreszeingekoppeltem Schafanti-Kaninchen-Globulin (Behringwerke Marburg) für 30 min angefärbt. Nicht gebundenes Kaninchenglobulin wurde mit PBS gewaschen. Kontrollen wurden mit Kaninchennormalserum und fluoreszeinkonjugiertem Antikaninchenserum behandelt (97, 99). Durch das Lufttrocknen bleiben die antigenen Bindungsstellen an der Zelloberfläche reaktiv, diejenigen im intrazellulären Raum werden freigelegt.

e) Morphologische Kriterien

Der allgemeine Zustand der Zellen und morphologische Veränderungen wurden ständig im Auflichtmikroskop (Wild M40) optisch verfolgt und fotografisch festgehalten. Für fluoreszeingefärbte Zellen wurde das Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Standard 18) verwendet.

f) Concanavalin A Adsorption an Zelloberflächen

Zellen, die in einer Dichte von $1.5 - 5 \times 10^4$ Zellen /cm² in kleinen Petrischalen oder Mikrottestplatten ausgesät waren, wurden nach 3 Tagen mit einer ³H-Con A Lösung in PBS für 30 min bei 4° inkubiert. Die anhaftenden Serumproteine wurden zuvor durch dreimaliges Waschen mit PBS von der Zelloberfläche abgelöst. Den Zellen wurden verschiedene Konzentrationen angeboten, bei gleichbleibender spezifischer Aktivität. Es wurden 3fach Bestimmungen gemacht. Als Kontrolle wurden Zellen mit kaltem Con A (2 - 4 mg/ml) präinkubiert, oder in Gegenwart von α-Methylmannosid (1M oder 0.1M) inkubiert. Zur Beendigung der Inkubation wurde das überschüssige ConA mit PBS abgewaschen, die Zellen mit 0.1M NaOH vom Plastik gelöst, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und ihre Radioaktivität gemessen. Methode nach Cuatrecasas (in 45).

B) Zur Charakterisierung der Syntheseprodukte

a) Inkubation mit radioaktiven Substanzen

Zur radioaktiven Inkubation wurde das normale Kulturmedium gegen Inkubationsmedium, das ^3H -Prolin enthielt, ausgetauscht. Die Inkubationszeit betrug 6 bzw. 24 h (normale Kulturbedingungen).

b) Extraktion und Aufarbeitung

Die Inkubation wurde dadurch beendet, daß das Medium abgegossen wurde, die Zellen mit eiskalter EDTA Lösung (1 %) von der Petrischale abgelöst wurden und die Zellzahl bestimmt wurde. Die Zellen wurden in 1M NaCl, 0.05M Tris-HCl pH 7.4 bei 4°C über mindestens 24 h extrahiert. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand mit dem Medium vereint, 1/10 dieses Volumens für die Aminosäureanalyse entnommen und dem Rest 25 mg lathyritisches Rattenhautkollagen als Träger zugefügt. Medium und Zell-extrakt wurden durch Dialyse gegen 0.5 % Essigsäure und 0.1M Natriumacetat pH 1.8 von nichtgebundenem Prolin befreit.

Gewinnung von Trägerkollagen

Trägerkollagen wurde aus lathyritischer Rattenhaut (LRHK) hergestellt. Es wurde als interner Marker während der Aufarbeitung, besonders für den Pepsinabbau und die Chromatographie zugesetzt.
Methode nach Piez (100).

c) Pepsinabbau

Zur Abtrennung des Kollagen von globulären Proteinen wurde die mit LRHK versetzte, radioaktiv markierte Probe einer schonenden Behandlung mit Pepsin (0.1 mg/ml) über 6 h bei 18°C unterworfen. Dabei werden alle nicht tripelhelikalen Proteine und die Propeptide des Kollagen

abgebaut. Nachdem zur Beendigung der Behandlung die Probe auf pH 7.4 gebracht worden war, wurde das Kollagen durch Dialyse gegen 17.5 % KCl, 0.02M Na_2HPO_4 pH 7.4 gefällt. Der Rückstand nach der Zentrifugation (20 000 g, 4°C, 60 min) wurde in 0.5 % Essigsäure gelöst und gegen den Startpuffer der Ionenaustauscherchromatographie dialysiert.

Methode nach Layman (101), Müller et al. (8)

d) Chromatographie

1. Ionenaustauscherchromatographie zur Trennung der α -Ketten

An CM-Cellulose wurde unter denaturierenden Bedingungen chromatographiert.

Säulenvolumen: 1,5 x 10 cm

Säulentemperatur: 45°C

Startpuffer: 1 M Harnstoff, 0.02 M Kaliumacetat pH 4.8

Gradient, linear: a) Hühnerkollagen:

O - 0.11M LiCl 800 ml Startpuffer

b) Kalbskollagen:

O - 0.14M LiCl 1 000 ml Startpuffer

Durchfluß: 180 - 200 ml/h aufsteigend

Fraktionen: 10 ml/3 min

Das Eluat wurde bei 226 nm mit einem Beckman Spektrophotometer DB in einer Mikrodurchflußküvette gemessen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden aus den Fraktionen jeweils 1 ml entnommen, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Beckman LS 250 Szintillationszähler gemessen.

Aus dem Verhältnis der Radioaktivitätsmenge im α_1 und α_2 Bereich des Chromatogramms kann nach folgender Formel der Anteil Typ II Kollagen berechnet werden:

$$\% \text{ Typ II} = \frac{\alpha_1/\alpha_2 - 2}{\alpha_1/\alpha_2 + 1} \times 100$$

wobei der Term im Zähler der Menge Typ II Kollagen,
der im Nenner dem Gesamtkollagen entspricht.

Methode nach Piez (100) und Pontz (9)

2. Molekulargewichtsbestimmung an Agarose 5

Säulenvolumen: 2.5 x 150 cm

Temperatur: Raumtemperatur

Durchfluß: 25 ml/h absteigend

Puffer: 1M CaCl₂, 0.05 M Tris-HCl pH 7.4

Denaturierungsbedingung: 30 min, 45°C

Faktionen: 7 ml/20 min

Radioaktivitätsmessung wie bei CM Cellulose

e) Bromcyanabbau

Entsalzte, lyophilisierte α -Ketten wurden mit 70 % Ameisensäure und BrCN versetzt, 15 min mit N₂ begast und 4 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Durch Lyophilisieren wurden die Peptide von BrCN und Ameisensäure befreit.

Methode nach Epstein (102)

f) SDS Slabgelelektrophorese

Kollagenketten, die Fraktionen der konditionierten Medien und BrCN Peptide wurden mit der Slabgelelektrophorese getrennt.

Geldimension: 110 x 110 x 1 mm

Breite des Einzelgels: 3 mm

Gradienten: 10 - 18 % (4.5 % Obergel) Acrylamid
für BrCN Peptide
5 - 10 % (3% Obergel) Acrylamid für
Kollagenketten

Aufgetragene Menge: bis zu 20 μ g

Aufgetragenes Volumen: 5 - 40 μ l

Denaturierende Bedingungen: 20 min, 55°C

Elektrophoresebedingungen: 4°C, 20 mA, 200 V

Färben: 30 min 0.25 % Coomassie-Blau in TCA

Autoradiographie:

Färben mit Szintillator: 3 h 25 % PPO in DMSO

Der Radioaktivitätsmenge entsprechend wurde das getrocknete Gel für 5 - 30 Tage auf einen Kodak Film Regulix BB 54 gelegt. Eine ausreichende Schwärzung des Films nach 10 Tagen wurde mit einer Radioaktivitätsmenge von ungefähr 1 000 cpm pro Bande erreicht.

Methode nach Laemmli (103)

g) Aminosäureanalyse der radioaktiv markierten Proteine

1/10 des löslichen Kollagen (Medium und Extrakt) und der Zellrückstand wurden bei 80°C über 30 min und durch Dialyse gegen 1M CaCl_2 pH 7.4 denaturiert, anschließend entsalzt und lyophilisiert.

Hydrolyse: 6N HCl, 1/2 000 Mercaptoäthanol,

N_2 Atmosphäre, 24 h, 110°C

Nach Entfernen der Salzsäure wurden die Aminosäuren am Analysator (Biocal) aufgetrennt. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen aufgefangen und die Radioaktivität in 1 ml Aliquoten gemessen.

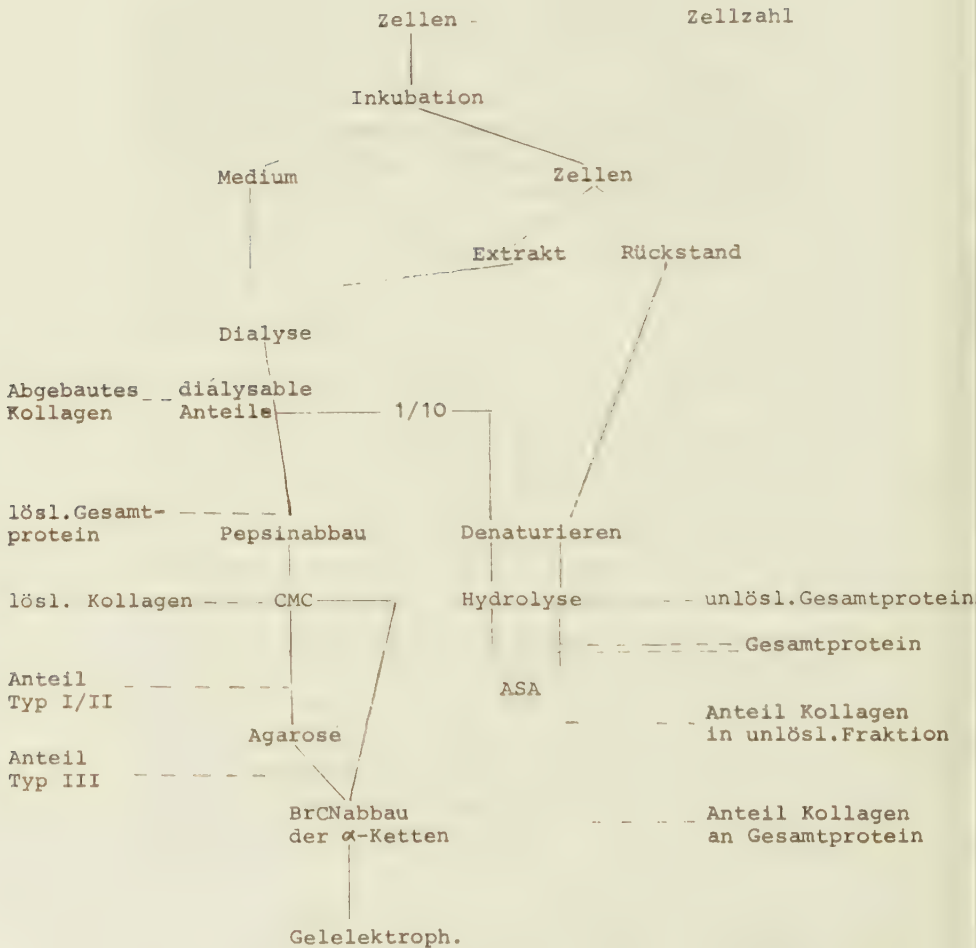
Aus der Radioaktivitätsmenge im Hyp- und Pro-Bereich konnte nach folgender Formel der Anteil Kollagen am Gesamtprotein berechnet werden:

$$\% \text{ Kollagen} = \frac{2 \times \text{cpmHyp}}{(\text{cpmPro} - \text{cpmHyp})5 + 2 \text{ cpmHyp}} \times 100$$

Beim Aufstellen der Formel wurde berücksichtigt:

- a) Der Menge Kollagen entspricht die doppelte Aktivitätsmenge des Hyp, da ungefähr jedes zweite Pro in Kollagen hydroxyliert ist.
- b) Da angenommen werden kann, daß Kollagen 5 x mehr Pro enthält als andere Proteine (40, 41) entspricht der Term $(\text{cpm Pro} - \text{cpm Hyp})/5$ dem nichtkollagenen Protein. Ergänzt mit dem kollagenen Anteil stellt der Nenner die Radioaktivitätsmenge des Gesamtprotein dar.

Aufarbeitungsschema



LITERATURVERZEICHNIS

1. Hay, B., Epithelial - Mesenchymal Interactions 1968
Editor: R. Fleischmayer, R.E. Billingham,
Williams & Wilkins Baltimore
2. von der Mark, K., von der Mark, H.,
J. Cell. Biol. 73, 736 (1977)
3. Fietzek, P.P., Kühn, K.
Int. Rev. Conn. Tissue. 7, 1 (1976)
4. Miller, E.J., Matukas V.J.
Fed. Proc., 33, 1197 (1974)
5. Miller, E.J.
Clin. Orthop. Related Res., 92, 260 (1973)
6. Grant, M.E., Prockop D.J.
New Engl. J. Med. 286, 194 (1972)
7. Prockop, D.J., Berg, R.A., Kivirikko, K.J., Uitto, J.
in Biochemistry of Collagen, Ed: G.N. Ramachandran und
A.H. Reddi, New York 1976
8. Müller, P.K., Jamhawi, O.
Biochem. Biophys. Acta 365, 158 (1974)
9. Pontz, B.F., Müller, P.K., Meigel, W.N.
J.Biol.Chem. 248, 7558 (1973)
10. Martin, G.R., Byers, P.H., Piez, K.A.
Advan. Enzymol. 42, 167 (1975)
11. Speakman, P.T.
Nature 229, 241 (1971)
12. Fessler, L.J., Morris, N.P., Fessler, J.H.
PNAS USA 72, 4905 (1975)
13. Traub, W., Piez, K.A.
Adv.Prot.Chem. 25, (243 (1971)

14. Bornstein, P.
Annu.Rev.Biochem. 43, 567 (1974)
15. Uitto, J., Lichtenstein, J.R.
J.Invset.Dermatol. 66, 59 (1976)
16. Meigel, W.N., Müller, P.K.
Med. Klin. 70, 1255 (1975)
17. McKusick, V.A., Heritable disorder of connective tissue
(Mosby, St. Louis 1972)
18. Vinson, W.C., Seyer, J.M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1024 (1971)
19. Penttinen, R.P., Lichtenstein, J.R., Martin, G.R.,
McKusick, V.A.
PNAS USA 72, 181 (1975)
20. Krieg, T., Müller, P.K.
Exp. Cell. Biol. 45, 207 (1977)
21. Perlsh, J.S., Bashley, R.J., Stephens, R.E., Fleischmayer, R.
Arth. Rheumat. 195, 891 (1976)
22. Le Roy, E.C.
J.Clin.Invest. 54, 880 (1974)
23. Müller P.K., Kühn, K.
Acta rhum.belg. 1, 23 (1977)
24. Abbott, J., Holtzer, H.
J.Cell Biology 28, 473 (1966)
25. Chacko, S., Abbott, J., Holtzer, S., Holtzer, H.
J. Exp. Med. 130, 417 (1969)
26. Cahn, R.D., Cahn, M.B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 106 (1966)
27. Coon, H.G.
Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 66 (1966)
28. Coon, H.G., Cahn, R.D.
Science 153, 1116 (1966)

29. Mayne, R., Schiltz, J.R., Holtzer, H.
Biology of fibroblasts (Ed. E.Kulonen, J.Pikkarainen)
Academic Press N.Y. 1973
30. Layman, D.L., Sokoloff, L., Miller, E.J.
Exp. Cell Res. 73, 107 (1972)
31. Lemmen, C. Doktorarbeit München 1975
32. Horwitz, A.L., Dorfman, A.
J.Cell Biol 45, 434 (1970)
33. Nevo, Z., Horwitz, A.L., Dorfman, A.
Develop. Biol. 28, 219 (1972)
34. Cheung, H.S., Harvey, W., Benya, P.D., Nimni, H.E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 137 (1976)
35. Bryan, J.
Exp. Cell Res. 52, 327 (1968)
36. Hough, A.J., Sokoloff, L.
Conn. Tiss. Res. 3, 27 (1975)
37. Müller, P.K., Lemmen, C., Gay, S., von der Mark, K., Kühn, K.
In Extracellular Matrix Influences on Gen Expression
Ed. Slavkin, Greulich Academic Press San Francisco 1975
38. Müller, P.K., Lemmen, C., Gauss, V., Gay, S., Kühn, K.
Exp. Cell Res. 108, 47 (1977)
39. Hermann, H., von der Mark, K.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1605 (1975)
40. Dayhoff, M.O., Hunt, L.T.
Atlas Protein Sequence Structure 5, (1972)
41. Jukes, T.H., Holmquist, R., Moise, H.
Science 189, 50 (1975)
42. Gale, E.F. In The Molecular Basis of Antibiotic Action
John Wiley London (1972)
43. Wiestner, M., Hörlein, D., Krieg, T., Glanville, R.,
Fietzek, P.P., Müller, P.K., in Vorbereitung

44. Brooks, R. Nature 260, 248 (1976)
45. Bittiger, H., Schnebli, H.P. (Ed.)
Concanavalin A as a Tool, J. Wiley London 1976
46. Temin, H. J.Cell Physiol. 78, 161 (1971)
47. Pohjanpelto, P. J. Cell. Physiol. 91, 387 (1977)
48. Burger, M.M. Nature 227, 170 (1970)
49. Zetter, B.R., Chen, L.B., Buchanan, J.M.
Cell 7, 407 (1976)
50. Pastan, I.H., Johnson, G.S., Anderson, W.B.
Ann. Rev. Biochem. 15, 491 (1975)
51. Deshmukh, K., Sawyer, B.D.
PNAS USA 74, 3864 (1977)
52. Drezner, M.K., Nealon, F.A., Lebovitz, H.E.
BBA 425, 521 (1976)
53. Young, C.W., Hodas, S. Science 146, 1172 (1964)
54. Ceccarini, C., Eagle, H.
PNAS USA 68, 229 (1971)
55. Dingle, J.T., Tell, H.B. in Lysosomes in Biology
and Pathology American Elsevier N.Y. 1969
56. Brighton, C.T., Schaffzin, E.A.
Calcif. Tissue Res. 6, 151 (1970)
57. Solursh, M., Meier, S.
Calcif. Tissue Res. 13, 131 (1973)
58. Abbott, J., Mayne, R., Holtzer, H.
Dev. Biol. 38, 430 (1972)
59. Schiltz, J., Mayne, R., Holtzer, H.
Differentiation 1, 97 (1973)
60. Mayne, R., Vail, M.S., Miller, E.J.
PNAS USA 72, 4511 (1975)
61. Strom, C.M., Dorfman, A.
PNAS USA 73, 3428 (1976)

62. von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H.,
Müller, P.K.
Nature 267, 531 (1977)
63. Schacter, L.P. Exp. Cell Res. 63, 33 (1970)
64. Solursh, M., Meier, S. Dev. Biol. 30, 279 (1973)
65. Solursh, M., Meier, S. Amer. Zool. 13, 1051 (1973)
66. Vaheri, A., Mosher, D.F.
BBA Reviews on Cancer 1977 in Druck
67. Mayne, R., Vail, M.S., Miller, E.J.
Dev. Biol. 54, 230 (1976)
68. Deshmukh, K., Kline, W.G.
Eur.J.Biochem. 69, 209 (1976)
69. Nimni, M., Deshmukh, K.
Science 181, 751 (1973)
70. Deshmukh, K., Henrick, S.
Arthritis Rheum. 19, 199 (1976)
71. Gay, S., Müller, P.K., Lemmen, C., Remberger, K.,
Matzen, K., Kühn, K. Klin. Wochensch. 54, 969 (1976)
72. Ursprung, H. The Stability of the Differentiated State
Springer Verlag, New York 1968
73. Sasse, J., Dessau, W., von der Mark, K.
in Vorbereitung
74. Bentz, H., Kühn, K. in Vorbereitung
75. Benya, P.D., Padilla, S.R., Nimni, M.E.
Biochem. 16, 865 (1977)
76. Holley, R.W.,
Nature 258, 487 (1975)
77. Schwarz, R.I., Bissell, M.J.
PNAS USA 74, 4453 (1977)
78. Schwarz, R.I., Colarusso, L., Doty, P.
Exp. Cell. Res. 102, 63 (1976)

79. Deshmukh, K., Kline, W.G., Sawyer, B.D.
FEBS Lett. 67, 48 (1976)
80. Burleigh, M.C., Barrett, A.J., Lazarus, G.S.
Biochem. J. 137, 387 (1974)
81. Moscona, A.A. in The Cell Surface in Development
Wiley, New York 1974
82. Hynes, R.O.
Reviews on Cancer, BBA 458, 73 (1976)
83. Hayflick, L.
Exp. Cell. Res. 37, 614 (1965)
84. Mayne, R., Vail, M.S., Mayne, P.M., Miller, E.J.
PNAS USA 73, 1674 (1976)
85. Deshmukh, K., Nimni, M.E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 424 (1973)
86. Howell, D.S.
Arthritis Rheum. 18, 167 (1975)
87. Marzullo, D. Dev. Biol. 27, 20 (1972)
88. Sampath, N.A., R.C. Siegel, G.R. Martin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 745 (1972)
89. Dehm, P., Prockop, D.J.
Eur., J. Biochem. 35, 159 (1973)
90. Cahn, R.D., Coon, H.B., Cahn, M.B.
in Methods in Developm. Biology 493 (1967)
91. Wiebkin, O.W., Muir, H.
FEBS Lett. 37, 42 (1973)
92. Ball, C.R., Poyuter, R.W., van den Berg, H.W.
Anal. Biochem. 46, 101 (1972)
93. Timpl, R., Glanville, R.W., Nowack, H., Wiedemann, H.,
Fietzek, PP, Kühn, K., Hoppe-Seylers's Z physiol Chem.
356, 1783 (1975)
94. Miller, E.J.
Biochemistry 11, 4903 (1972)

95. Furthmayr, H., Timpl, R.
Int. rev.connect tissue res 7, 61 (1976)
96. Beil, W., Timpl, R., Furthmayr, H.
Immunology 24, 13 (1973)
97. Wick, G., Furthmayr, H., Timpl, R.
Int. arch. allergy appl. immunol 48, 664 (1975)
98. Nowack, H., Gay, S., Wick, G., Becker, U., Timpl, R.,
J immunol methods 12, 117 (1976)
99. Gay, S., Martin, G.R., Müller, P.K., Timpl, R., Kühn, K.
Proc. natl. acad sci US 73, 4037 (1976)
100. Piez, K.A., Eigner, E.A., Lewis, M.S.
Biochem. 2, 58 (1963)
101. Layman, D.L., McGoodwin, E.B., Martin, G.R.
PNAS USA 69, 454 (1971)
102. Epstein, E.H., Scott, R.D., Miller, E.J., Piez, K.A.
J.Biol.Chem. 246, 1718 (1971)
103. Laemmli, V.K.
Nature 227, 680 (1970)

D A N K S A G U N G

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Kühn durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kühn danke ich für die Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. Peter Müller gilt mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit, für wertvolle Anregungen, Ratschläge und Diskussionen.

Danken möchte ich auch allen Kollegen innerhalb unserer Abteilung, die mir mit experimenteller Erfahrung geholfen haben.

Frau H. Kadner, Fräulein B. Stüber und A. Pavlovic danke ich für freundliche Mithilfe.

Lebenslauf

Name Verena Gauss

geboren 8.9.1949 in Stuttgart

Eltern Dieter H. Gauss, Kaufmann
Helga Gauss, geb. Thiemann

Schule Evangelisches Mörike Gymnasium Stuttgart 1959 - 68

Studium Biologie und Chemie an den Universitäten
Tübingen und Berlin 1968 - 1974
Abschluß: Diplom in Biologie, Staatsexamen in Chemie
Biochemie am Mount Holyoke College Mass. USA
1970 - 1971

Referendar für das Gymnasium, Oberschulamt Baden-Württemberg
1974 - 1975
Abschluß: Staatsexamen für das Lehramt an höheren
Schulen in den Fächern Biologie und Chemie

Promotionsstudium an der Universität München im
Fachbereich Chemie und Pharmazie
Doktorarbeit in der Abteilung Bindegewebsforschung
des Max-Planck-Instituts für Biochemie in
Martinsried bei München.

